



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

**Tipagem molecular de isolados clínicos e ambientais do  
complexo de espécies de *Cryptococcus neoformans* através do  
gene da fosfolipase B (*PLB1*) e avaliação da susceptibilidade  
antifúngica**

**Carina Andreia Tavares Máximo**

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**OUTUBRO, 2012**



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

**Tipagem molecular de isolados clínicos e ambientais do  
complexo de espécies de *Cryptococcus neoformans* através do  
gene da fosfolipase B (*PLB1*) e avaliação da susceptibilidade  
antifúngica**

**Mestranda:** Carina Andreia Tavares Máximo

**Orientadora:** Investigadora Doutora Maria da Luz Martins

**Co-orientador:** Investigador Doutor Fernando Teles

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do  
grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular em  
Medicina Tropical e Internacional

**OUTUBRO, 2012**

*Aos meus pais, que me têm ensinado o  
objectivo da vida:*

*“Daqui a vinte anos vais estar mais desapontado pelas  
coisas que não fizeste do que pelas que fizeste. Por isso,  
livra-te de todas as amarras. Afasta-te do Porto de  
Abrigo. Apanha o vento nas velas. Explora. Sonha.  
Descobre.”*

*Mark Twain*

## AGRADECIMENTOS

Quero desde já expressar um agradecimento muito especial à minha orientadora, Investigadora Doutora Maria da Luz Martins, por me ter concedido a oportunidade de integrar a equipa do Laboratório de Micologia. Obrigada pela disponibilidade, sabedoria e ensinamentos constantes durante o processo de orientação científica desta dissertação, tal como incentivo e confiança para que fez com que os meus horizontes académicos e profissionais se expandissem.

Ao meu co-orientador, Investigador Doutor Fernando Teles, pelos conhecimentos e apoio transmitidos durante todo o projecto, bem como a sua disponibilidade para contribuir para o rigor científico do mesmo. Pelo seu incentivo e *feedback* sempre construtivo, o meu sincero agradecimento.

À Técnica Superior Ana Paula Maduro, por toda a disponibilidade demonstrada para a minha integração, por todo o companheirismo e boa disposição que se revelaram fundamentais para concretização deste trabalho.

À Doutora Ana Sampaio e à Doutora Ana Sofia Ferreira da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, agradeço a cedência dos isolados ambientais provenientes de Vila Real, sem os quais parte deste trabalho não teria o mesmo valor científico.

À Heloísa Antoniazzi e à restante equipa do Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, pela disponibilidade demonstrada para recuperação de alguns isolados da colecção.

Às minhas colegas e amigas de mestrado, Camila e Patrícia, pelo seu incondicional apoio e amizade demonstrada nesta etapa da nossa vida. Pelos momentos de risada e de *stress* que partilhamos e superamos juntas.

Aos meus colegas de trabalho da Bioalvo S.A, pelo incontornável apoio e compreensão, pelo crescimento pessoal e profissional conquistado e partilhado com todos vocês, que se revelou crucial para alcançar o sucesso nesta etapa da minha vida.

Aos meus amigos o meu profundo agradecimento por muitos dos melhores momentos da minha vida, pelo incansável incentivo e incontornável amizade demonstrada.

Por último, à minha família pelo amor, carinho e apoio, em especial aos meus pais pelas incondicionais manifestações de encorajamento e confiança em todas as minhas escolhas.

A todos o meu sincero obrigada!

## RESUMO

### **Tipagem molecular de isolados clínicos e ambientais do complexo de espécies de *Cryptococcus neoformans* através do gene da fosfolipase B (*PLB1*) e avaliação da susceptibilidade antifúngica**

Carina Andreia Tavares Máximo

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura encapsulada, presente em animais e humanos, que infecta tanto indivíduos imunocomprometidos como imunocompetentes. A criptococose é uma causa significativa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, sendo a meningoencefalite o sinal mais frequente da doença. Duas espécies estão incluídas no complexo de *Cryptococcus neoformans*: *C. gattii* (serotipos B e C) e *C. neoformans*. Por sua vez, *C. neoformans* é dividido em duas grandes variedades - var. *grubii* (serotipo A) e var. *neoformans* (serotipo D) –, além de incluir estirpes híbridas (serotipo AD). A técnica de RFLP tem sido usada para identificar facilmente os tipos moleculares dos isolados em estudos epidemiológicos. Oito tipos foram descritos: VNI, VNII (ambos correspondentes a estirpes *C. neoformans* var. *grubii*), VNIII (estirpes híbridas AD), VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*), e VGI-IV (correspondentes a *C. gattii*). Este trabalho teve como objectivo, caracterizar geneticamente uma colecção de isolados clínicos e ambientais, portugueses e estrangeiros, e avaliar a sua resistência a duas drogas antifúngicas, permitindo comparar os padrões epidemiológicos do complexo de espécies com os encontrados noutras regiões do mundo. A colecção possui 337 isolados de *C. neoformans*, provenientes de diversos hospitais e regiões, previamente identificados por métodos convencionais de diagnóstico. A determinação dos tipos moleculares foi realizada através do método de RFLP no gene *PLB1*. Dos 267 isolados analisados, o tipo mais abundante foi VN I (61,42%), seguido por VN III (24,34%). Menos abundantes foram VN IV (10,11%) e VN II (3%), enquanto que VG I foi raro (1,12%). Os restantes tipos moleculares de *C. gattii* não foram encontrados. Usando o método de difusão em disco, 98 destes isolados foram analisados quanto à susceptibilidade antifúngica. Foi registada resistência ao voriconazol em apenas 3,1% dos isolados testados. Foi encontrada resistência ao fluconazol num elevado número de isolados (32,7%) e susceptibilidade dependendo da dose em 15,3%. Este trabalho, também teve o intuito de correlacionar os resultados anteriores com o tipo molecular. Todavia não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre qualquer dos tipos moleculares e as CMIs correspondentes ao fluconazol. Porém, os resultados mostram que alguns tipos moleculares são menos susceptíveis do que outros em relação ao voriconazol: VN I e VN IV são mais resistentes do que VN II, e VN I e VN II são mais susceptíveis que VN III. Concluindo, a elevada frequência de VN I está de acordo com resultados obtidos em outros estudos em países Europeus e Sul-Americanos. É notável a abundância de VN III em Portugal, tal como relatado noutros países do Sul da Europa, mas também no Chile, contrariamente a outras regiões do globo. A elevada resistência ao fluconazol é compatível com os resultados documentados em estudos anteriores. Esta investigação é um importante passo na epidemiologia da criptococose e da ocorrência de *C. neoformans* em Portugal.

**Palavras-chave:** Complexo de espécies *Cryptococcus neoformans*; gene *PLB1*; tipos moleculares; susceptibilidade antifúngica

## ABSTRACT

### **Molecular typing of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* species complex using the phospholipase B (*PLB1*) gene and assessment of antifungal susceptibility**

Carina Andreia Tavares Máximo

*Cryptococcus neoformans* is an encapsulated yeast that is present in animals and humans, both in immunocompromised and immunocompetent individuals. Cryptococcosis is a significant cause of morbidity and mortality worldwide, being meningoencephalitis the most frequent sign of disease. Two species are included on the *Cryptococcus neoformans* complex: *C. gattii* (serotypes B and C) and *C. neoformans*. Among *C. neoformans*, two major varieties exist - var. *grubii* (serotype A) and var. *neoformans* (serotype D) -, as well as hybrid strains (serotype AD). Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis has been used to easily identify the molecular types of isolates in epidemiological studies. As such, 8 types have been described: VNI, VNII (both corresponding to *C. neoformans* var. *grubii* strains), VNIII (serotype AD hybrid strains), VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*), and VGI-IV (all corresponding to *C. gattii*). The goal of this work was to genetically characterize a collection of clinical and environmental Portuguese and foreign isolates, and to assess their resistance to 2 antifungal drugs, aimed at comparing the epidemiological patterns of the species complex to those found in other regions of the world. The collection possesses 337 *C. neoformans* isolates obtained from several hospitals and regions, previously identified using conventional mycological diagnosis. The determination of molecular types was performed using the RFLP method on the *PLB1* gene. From the 267 isolates analyzed, the VN I type was the most abundant (61.42%), followed by VN III (24.34%). Less abundant were VN IV (10.11%) and VNII (3%), whilst VG I were rare (1.12%). The other molecular types of *C. gattii* were not found. Using the disk diffusion method, 98 of these isolates were analyzed for antifungal susceptibility. Resistance to voriconazole was found in just 3.1% of the isolates studied. High resistance to fluconazole was registered in a relevant number of isolates (32.7%) and resistance depending on the drug dose in 15.3% other isolates. In this work, it was also aimed to correlate the previous results with the molecular types, although there was not statistically meaningful difference found between any molecular type and the MIC of fluconazole. However the results show that some molecular types are less susceptible than others regarding voriconazole: VN I and VN IV are more resistant than VN II, and VN I and VN II are more susceptible than VN III. In conclusion, the high frequency of VN I agrees with results from other European and South-American countries. It is remarkable the abundance of VN III (hybrid strains) in Portugal, as reported in other Southern European countries, but also in Chile, yet unlike in other regions of the world. Plus, the resistance to fluconazole, in a significant number of isolates is comparable to that found in previously documented studies. This investigation is an important step for the epidemiology of cryptococcosis and occurrence of *C. neoformans* in Portugal.

**Keywords:** *Cryptococcus neoformans* species complex; *PLB1* gene; molecular types; antifungal susceptibility

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Importância clínica das micoses humanas .....	2
1.2 Características gerais das espécies do complexo <i>Cryptococcus neoformans</i> ..	4
1.3 Ecologia e epidemiologia das espécies do complexo <i>C. neoformans</i> .....	8
1.3.1 <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> e <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> .....	10
1.3.2 <i>C. gattii</i> .....	11
1.4 Factores de virulência de <i>C. neoformans</i> .....	14
1.4.1 Cápsula .....	17
1.4.2 Melanina .....	20
1.4.3 Temperatura .....	21
1.4.4 <i>Mating type</i> .....	23
1.4.5 Fosfolipases .....	24
1.5 Importância clínica e manifestações da criptococose .....	28
1.5.1 Modo de infecção .....	31
1.5.2 Características clínicas .....	35
1.5.3 Tratamento .....	36
1.6 Diagnóstico laboratorial convencional de <i>C. neoformans</i> .....	38
1.7 Diagnóstico molecular de <i>C. neoformans</i> .....	40
Plano da dissertação .....	42
 <b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	 <b>44</b>
2.1 Estirpes estudadas .....	45
2.2 Identificação dos isolados por métodos convencionais .....	49
2.2.1 Exame directo .....	49
2.2.2 Cultura .....	49



2.2.3 Pesquisa de antígeno de <i>C. neoformans</i> .....	49
2.2.4 Identificação bioquímica .....	50
2.3 Genotipagem de isolados de <i>C. neoformans</i> por RFLP do gene <i>PLB1</i> .....	53
2.3.1 Extracção do DNA genómico de leveduras .....	53
2.3.2 Análise da qualidade do DNA extraído .....	54
2.3.3 Purificação do DNA .....	54
2.3.4 Preparação do DNA para PCR .....	55
2.3.5 Amplificação do gene <i>PLB1</i> de <i>C. neoformans</i> .....	55
2.3.6 Polimorfismos de restrição do gene <i>PLB1</i> de <i>C. neoformans</i> .....	57
2.3.7 Análise comparativa .....	58
2.4 Estudo da sensibilidade aos antifúngicos pelo método de Kirby-Bauer .....	59
2.4.1 Preparação do inóculo .....	59
2.4.2 Inoculação das placas .....	59
2.4.3 Aplicação dos discos antifúngicos .....	60
2.4.4 Leitura das placas .....	60
2.4.5 Interpretação dos resultados .....	60
2.5 Análise estatística .....	62
 <b>3. RESULTADOS</b> .....	 63
3.1 Estirpes estudadas .....	64
3.2 Identificação dos isolados por métodos convencionais .....	67
3.2.1 Exame directo .....	67
3.2.2 Cultura .....	68
3.2.3 Pesquisa de antígeno de <i>C. neoformans</i> .....	70
3.2.4 Identificação bioquímica .....	71
3.3 Genotipagem de isolados de <i>C. neoformans</i> por RFLP do gene <i>PLB1</i> .....	73
3.3.1 Extracção do DNA genómico de leveduras .....	73

3.3.2	Análise da qualidade do DNA extraído .....	73
3.3.3	Amplificação do gene <i>PLB1</i> de <i>C. neoformans</i> .....	74
3.3.4	Polimorfismos de restrição do gene <i>PLB1</i> de <i>C. neoformans</i> .....	75
3.3.5	Análise comparativa .....	81
3.4	Estudo da sensibilidade aos antifúngicos pelo método de Kirby-Bauer .....	83
3.5	Análise estatística .....	87
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....</b>	<b>89</b>
4.1	Estirpes estudadas .....	90
4.2	Identificação dos isolados por métodos convencionais .....	95
4.2.1	Exame directo .....	95
4.2.2	Cultura .....	95
4.2.3	Pesquisa de antígeno de <i>C. neoformans</i> .....	96
4.2.4	Identificação bioquímica .....	98
4.3	Genotipagem de isolados de <i>C. neoformans</i> por RFLP do gene <i>PLB1</i> .....	99
4.3.1	Extracção do DNA genómico de leveduras e análise da sua qualidade .	99
4.3.2	Amplificação do gene <i>PLB1</i> de <i>C. neoformans</i> .....	101
4.3.3	Polimorfismos de restrição do gene <i>PLB1</i> de <i>C. neoformans</i> .....	102
4.3.4	Análise comparativa .....	110
4.4	Estudo da sensibilidade aos antifúngicos pelo método de Kirby-Bauer .....	113
4.5	Análise estatística .....	120
	Considerações finais .....	122
	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>125</b>

<b>ANEXOS .....</b>	<b>143</b>
ANEXO I .....	144
ANEXO II .....	161
ANEXO III .....	165
ANEXO IV .....	167
ANEXO V .....	173
ANEXO VI .....	179

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Preparação com tinta-da-China para visualização da cápsula polissacarídica de <i>C. neoformans</i> (Ellis <i>et al.</i> 2007).....	5
<b>Figura 2.</b> Fases do ciclo de vida de <i>C. neoformans</i> (Adaptado de Hull & Heitman 2002).....	6
<b>Figura 3.</b> Locais de acção de algumas fosfolipases. <b>A.</b> A1, fosforilase 1; A2, fosforilase 2; B, fosforilase B (PLB); C, fosforilase C (PLC); D, fosforilase D (PLD); <b>B.</b> lisofosfolipase e lisofosfolipase transacilase. (Adaptado de Ghannoum, 2000).....	25
<b>Figura 4.</b> Ciclo infeccioso de <i>C. neoformans</i> (Adaptado de Hull & Heitman 2002). ....	32
<b>Figura 5.</b> Teste de aglutinação com o <i>kit</i> Pastorex Crypto PLUS <sup>®</sup> (Biorad Laboratories Inc., EUA) para determinação da presença de antígeno capsular em amostras clínicas.....	50
<b>Figura 6.</b> <i>Kit</i> comercial API ID 32C <sup>®</sup> (Biomérieux, França), para identificação bioquímica de leveduras.....	51
<b>Figura 7.</b> Método de inoculação da levedura no meio de cultura para a realização dos testes de sensibilidade aos antifúngicos com difusão a partir de disco (método de Kirby-Bauer).....	59
<b>Figura 8.</b> Observação de <i>C. neoformans</i> (CN 355) em preparação com tinta-da-China (ampliação de 1500x).....	67
<b>Figura 9.</b> Observação de <i>C. neoformans</i> (CN 276) em preparação com tinta-da-China (ampliação de 1500x).....	68
<b>Figura 10.</b> Observação macroscópica da cultura do isolado CN 220. ....	69

<b>Figura 11.</b> Observação microscópica da cultura do isolado CN 22 (ampliação de 1500x).....	69
<b>Figura 12.</b> Observação microscópica da cultura do isolado CN 177 (ampliação de 1500x).....	70
<b>Figura 13.</b> Resultado do teste de aglutinação com o <i>kit</i> Pastorex Crypto PLUS® (Biorad Laboratories Inc., EUA). <b>A.</b> O isolado CN 355 apresentou aglutinação. <b>B.</b> Controlo negativo do teste.....	71
<b>Figura 14.</b> Resultado do teste bioquímico realizado pelo sistema API ID 32C® (Biomérieux, França) com o isolado CN 183.....	72
<b>Figura 15.</b> Imagem electroforética da reacção de amplificação obtida com <i>primers</i> específicos para o gene <i>PLB1</i> de <i>C. neoformans</i> .....	75
<b>Figura 16.</b> Perfis obtidos por electroforese com restrição com a enzima <i>AvaI</i> nas estirpes de referência descritas em Latouche <i>et al.</i> 2003.....	76
<b>Figura 17.</b> Perfis electroforéticos de alguns isolados da colecção estudada, obtidos após amplificação do gene <i>PLB1</i> seguida de restrição com a endonuclease <i>AvaI</i> . Estão representados os tipos moleculares VN III (CN 40, CN 126, CN 326), VN IV (CN 80, CN 86, CN 108, CN 312, CN 313) e VN I (CN 91, CN 350). O marcador de pesos moleculares de 100 pb também está representado.....	77
<b>Figura 18.</b> Perfis electroforéticos de alguns isolados da colecção estudada, obtidos após amplificação do gene <i>PLB1</i> seguida de restrição com a endonuclease <i>AvaI</i> . Estão representados os tipos moleculares VN I (CN 43, CN 153, CN 156, CN 158, CN 159, CN 160, CN 185, CN 192), VN IV (CN 146), VG I (CN 149), VN II (CN 155) e VN III (CN 197). O marcador de pesos moleculares de 100 pb também está representado. ....	78

<b>Figura 19.</b> Distribuição geográfica dos tipos moleculares obtidos pela análise de 245 isolados clínicos e ambientais portugueses por PCR-RFLP do gene <i>PLB1</i> .....	80
<b>Figura 20.</b> Dendrograma geral obtido através do programa GelCompar II® (Applied Maths, Bélgica).....	82
<b>Figura 21.</b> Fotografias dos halos de inibição aos antifúngicos fluconazol e voriconazol. As imagens foram obtidas através do <i>software</i> BIOMIC Expert-System® (Giles Scientific Inc., EUA). Relativamente ao fluconazol, CN 92 foi classificado como resistente, CN 63 como susceptível e CN 251 como susceptível dependendo da dose. CN 130 demonstrou ser resistente ao voriconazol.....	83
<b>Figura 22.</b> Dendrograma gerado pelo programa informático GelCompar II® (Applied Maths, Bélgica) com 273 isolados usando coeficiente de Dice e o método UPGMA.....	168

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Prevalência dos tipos moleculares encontrados no total de 267 isolados analisados.....	79
<b>Gráfico 2.</b> Percentagem de isolados resistentes, susceptíveis e susceptíveis dependendo da dose aos dois antifúngicos estudados, fluconazol e voriconazol, pelo método de Kirby-Bauer.....	84

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Serotipos e tipos moleculares correspondentes a cada espécie e variedade de <i>C. neoformans</i> . (Adaptado de Lin & Heitman 2006).....	41
<b>Tabela 2.</b> Estirpes de referência usadas, respectiva origem, tipo molecular e serotipo.....	47
<b>Tabela 3.</b> Proveniência dos isolados clínicos portugueses estudados neste trabalho: região do país, unidades hospitalares e número de isolados.....	48
<b>Tabela 4:</b> Sequência oligonucleotídica dos <i>primers</i> usados na reacção de PCR para amplificação do gene <i>PLB1</i> de <i>C. neoformans</i> . Dimensão do fragmento esperado ~1970 pb.....	55
<b>Tabela 5.</b> Mistura reaccional da reacção de PCR utilizada para amplificação do gene <i>PLB1</i> de <i>C. neoformans</i> .....	56
<b>Tabela 6:</b> Programa de PCR utilizado para a reacção de amplificação do gene <i>PLB1</i> de <i>C. neoformans</i> .....	56
<b>Tabela 7:</b> Sequências nucleotídicas reconhecidas pela endonuclease <i>AvaI</i> e respectivos locais de restrição.....	57
<b>Tabela 8:</b> Mistura reaccional da reacção de RFLP utilizada com o gene <i>PLB1</i> de <i>C. neoformans</i> amplificado por PCR.....	58
<b>Tabela 9:</b> Valores padrão para leveduras, do diâmetro do halo da inibição e CMIs correspondentes, segundo a norma M44-A do CLSI (72 horas de incubação para <i>C. neoformans</i> ).....	61
<b>Tabela 10.</b> Isolados para os quais se realizou o teste bioquímico e respectivo resultado.....	72



<b>Tabela 11.</b> Resultados obtidos com o teste de sensibilidade ao fluconazol e voriconazol dos isolados clínicos e ambientais de origem Portuguesa, realizado pelo método de Kirby-Bauer.....	85
<b>Tabela 12.</b> CMIs obtidas nos testes de susceptibilidade <i>in vitro</i> , aos antifúngicos fluconazol e voriconazol (parâmetros obtidos pelo <i>software</i> SPSS® (IBM, EUA)).....	87
<b>Tabela 13.</b> Isolados de origem clínica estudados neste trabalho provenientes de unidades hospitalares da Grande Lisboa. Respectiva data, sexo e idade dos pacientes, hospitais de origem, produto biológico, pesquisa de antigénio, informações adicionais relevantes, bem como o resultado obtido (testes bioquímicos, extracção de DNA e tipos moleculares de <i>C. neoformans</i> ).....	145
<b>Tabela 14.</b> Isolados de origem clínica estudados neste trabalho provenientes de unidades hospitalares do Porto e Vila Real. Respectiva data, sexo e idade dos pacientes, hospitais de origem, produto biológico, pesquisa de antigénio, informações adicionais relevantes, bem como o resultado obtido (testes bioquímicos, extracção de DNA e tipos moleculares de <i>C. neoformans</i> ).....	155
<b>Tabela 15.</b> Isolados de origem ambiental portuguesa estudados neste trabalho, respectivo ano de colheita, cidade de origem e tipo de amostra.....	158
<b>Tabela 16.</b> Isolados de origem não-portuguesa (clínicos e ambientais) estudados neste trabalho, respectivo ano de colheita, sexo e idade dos pacientes, hospitais de origem, produto biológico, pesquisa de antigénio e informações adicionais relevantes.....	159
<b>Tabela 17.</b> Estirpes de referência estudadas neste trabalho, respectiva origem, produto biológico e informações adicionais relevantes.....	160
<b>Tabela 18.</b> Isolados provenientes de pacientes com mais do que um isolamento de <i>C. neoformans</i> , respectiva data, hospital de origem e produto biológico.....	162

<b>Tabela 19.</b> Amostras em que foi avaliada a qualidade do DNA extraído no Nanodrop <sup>®</sup> (sem e com purificação).....	166
<b>Tabela 20.</b> Resultados obtidos nos testes de susceptibilidade ao fluconazol e voriconazol, com os isolados de origem clínica portuguesa seleccionados. Respectivos tipos moleculares, diâmetro do halo, caracterização de sensibilidade ou resistência e CMI.....	174
<b>Tabela 21.</b> Resultados obtidos nos testes de susceptibilidade ao fluconazol e voriconazol, com os isolados de origem ambiental portuguesa seleccionados. Respectivos tipos moleculares, diâmetro do halo, caracterização de sensibilidade ou resistência e CMI.....	176
<b>Tabela 22.</b> Resultados obtidos nos testes de susceptibilidade ao fluconazol e voriconazol, com os isolados de proveniência estrangeira seleccionados. Respectivos tipos moleculares, diâmetro do halo, caracterização de sensibilidade ou resistência e CMI.....	177
<b>Tabela 23.</b> Resultados obtidos nos testes de susceptibilidade ao fluconazol e voriconazol, com as estirpes de referência seleccionados. Respectivos tipos moleculares, diâmetro do halo, caracterização de sensibilidade ou resistência e CMI.....	178
<b>Tabela 24.</b> Resultados obtidos com o programa SPSS <sup>®</sup> (IBM, EUA) através da análise estatística da correlação entre os tipos moleculares de <i>C. neoformans</i> e as respectivas CMIs relativamente ao fluconazol e voriconazol.....	180

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>A</b>	Adenina
<b>A<math>\alpha</math></b>	Absorvância
<b>ABC</b>	<i>ATP-binding cassette</i>
<b>AFLP</b>	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino, do inglês <i>bovine serum albumine</i>
<b>C</b>	Citosina
<b>CBS</b>	<i>Centraalbureaud voor Schimmelcultures</i>
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CMI</b>	Concentração Mínima Inibitória
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótido-trifosfato
<b>DPPC</b>	Dipalmitoilfosfatidilcolina
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiaminotetracético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked-immunosobent assay</i>
<b><i>et al.</i></b>	“E outros”, da locução latina <i>et alii</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>g</b>	Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)
<b>G</b>	Guanina
<b>GXM</b>	Glucuronoxilomanano
<b>GalXM</b>	Galactoxilomanano

<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>HAART</b>	Terapêutica anti-retroviral altamente activa, do inglês <i>highly active antiretroviral therapy</i>
<b>HC</b>	Hospital de Cascais
<b>HCC</b>	Hospital Curry Cabral
<b>HEM</b>	Hospital Egas Moniz
<b>HGO</b>	Hospital Garcia de Orta
<b>HMB</b>	Hospital Militar de Belém
<b>HPC</b>	Hospital Prisional de Caxias
<b>HSA</b>	Hospital de Santo António
<b>HSB</b>	Hospital São Bernardo
<b>HSFX</b>	Hospital São Francisco Xavier
<b>HSJ</b>	Hospital de São João
<b>HSM</b>	Hospital de Santa Maria
<b>HVR</b>	Hospital de Vila Real
<b>IHMT</b>	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
<b>IPO</b>	Instituto Português de Oncologia
<b>LBA</b>	Lavado bronco-alveolar
<b>LCR</b>	Líquido Cefalorraquidiano
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>mg</b>	miligrama
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>MLST</b>	<i>Multilocus sequence typing</i>
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mM</b>	Milimolar

<b>n</b>	Dimensão da amostra
<b>NA</b>	Não aplicável
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>ND</b>	Não determinado
<b>ng</b>	Nanograma
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacção em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>
<b>pH</b>	Simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniónica de uma solução (-log [H <sup>+</sup> ])
<b>PLB</b>	Fosfolipase B
<b>PYCC</b>	<i>Portuguese Yeast Culture Collection</i>
<b>R</b>	Resistente
<b>RAPD</b>	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
<b>RFLP</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<b>rpm</b>	Aceleração em rotações por minuto
<b>S</b>	Susceptível/Sensível
<b>SDD</b>	Susceptível/Sensível Dependente da Dose
<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , em português Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>SIRI</b>	Síndrome Inflamatório de Reconstituição Imune
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>sp.</b>	Espécie
<b>T</b>	Timina
<b>TBE</b>	Tampão Tris-borato-EDTA
<b>TE</b>	Tris-EDTA

<b>Tris-HCl</b>	Tris-Hidrocloreto
<b>U</b>	Unidades
<b>UPGMA</b>	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
<b>UNL</b>	Universidade Nova de Lisboa
<b>var.</b>	variedade
<b>VIH</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitro

## **1. INTRODUÇÃO**

---

### 1.1 Importância clínica das micoses humanas

Durante as últimas décadas, os fungos emergiram como agentes etiológicos de infecções, tendo havido assim um aumento da frequência das infecções fúngicas oportunistas, passando estas a ser uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade (Ascioglu *et al.* 2002). Já foram descritas cerca de 70 000 espécies fúngicas, porém é estimado que existam aproximadamente 1.5 milhões. Apenas cerca de 270 destas espécies têm sido relacionadas com casos de doença em humanos, apesar deste número aumentar anualmente. A maioria destas espécies são dermatófitos que, não estando bem adaptados ao crescimento a altas temperaturas, causam apenas infecções superficiais (Lin & Heitman 2006). Grande parte das espécies fúngicas crescem idealmente entre 25 e 35 °C, e apenas algumas aparentam ser termotolerantes (crescimento a 35-40 °C), sendo que esta característica fisiológica se torna um pré-requisito fenotípico para micoses invasivas e, consequentemente, doença em hospedeiros mamíferos. Apesar do número de infecções fúngicas ter vindo a aumentar ligeiramente com o acréscimo do número de hospedeiros em estado crítico, torna-se claro que a temperatura do corpo humano é o primeiro factor protector contra micoses invasivas, mesmo para hospedeiros com a imunidade reduzida (Perfect 2006). Diversas razões têm sido propostas para explicar o crescimento de infecções fúngicas invasivas, incluindo o uso de agentes imunossupressores e antineoplásicos, antibióticos de largo espectro, uso de próteses e excertos, e cirurgias invasivas. Pacientes com queimaduras, neutropenia, infecção por VIH e outras causas de debilidade imunitária, também estão predispostos a infecção fúngica (Enoch *et al.* 2006). Espécies até agora consideradas saprófitas estão a a ser mais frequentemente associadas a infecções oportunistas humanas (Pincus *et al.* 2007).

Várias espécies fúngicas podem ser a causa de infecções invasivas, sendo as leveduras do género *Candida* responsáveis por cerca de 70-90% destas infecções. Contudo, *Cryptococcus neoformans* tem ganho nas últimas décadas uma importância crescente a nível hospitalar, principalmente em doentes imunologicamente debilitados. Este fungo pode infectar ou disseminar-se para qualquer órgão, causando infecção localizada, invadindo os pulmões, a pele, olhos, miocárdio, ossos, próstata ou tracto urinário, mas é principalmente mais propenso a infectar o sistema nervoso central



(SNC), sendo a sua forma clínica mais comum a meningoencefalite (Lin & Heitman 2006).

A fim de assegurar uma terapia apropriada e atempada e detectar espécies patogénicas emergentes, é imperativo que as leveduras sejam identificadas com precisão até ao nível da espécie. As infecções invasivas por leveduras estão associadas a elevados níveis de morbilidade e mortalidade, sendo que a sua rápida e rigorosa identificação pode contribuir para o sucesso da terapêutica mais precocemente e subsequente redução de falsos resultados (Pincus *et al.* 2007).

## 1.2 Características gerais das espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*

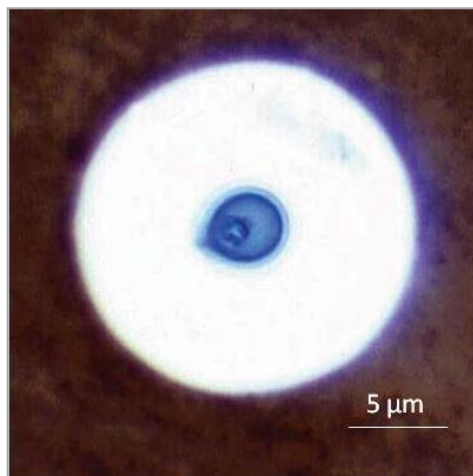
Do conjunto de espécies de *Cryptococcus* fazem parte os agentes fúngicos mais comuns causadores de meningite fúngica no mundo, sendo esta infecção associada a elevada morbidade e mortalidade (Chen *et al.* 1997; Cox *et al.* 2001; Feng *et al.* 2008). São reconhecidas cerca de 37 espécies de *Cryptococcus* e, apesar de a maioria ser incapaz de crescer a 37 °C, não causando habitualmente doença, *C. neoformans* e *Cryptococcus gattii* são as principais espécies patogénicas em humanos e animais (Lin & Heitman 2006; Li & Mody 2010).

Estes fungos, são saprófitas de vida livre com complexas capacidades bioquímicas que permitem a sua sobrevivência em condições ambientais variadas (Harrison 2000). A simplicidade de requisitos nutricionais facilita o seu crescimento e manutenção em laboratório. Na verdade, estas espécies sintetizam a maioria dos aminoácidos, açúcares, lípidos e vitaminas de que necessitam a partir do amoníaco. Contudo, nem todos os aminoácidos podem servir de fonte de carbono. A capacidade deste fungo utilizar compostos simples como fonte de carbono e azoto é consistente com o facto de estar adaptado a sobreviver em nichos ecológicos variados. O oxigénio é um nutriente crítico para o crescimento de *C. neoformans* e *C. gattii*, cujo desenvolvimento e sobrevivência são altamente dependentes da disponibilidade desta substância (Casadevall & Perfect 1998).

Os isolados clínicos de *C. neoformans* e de *C. gattii* são capazes de crescer a 37 °C, produzem a enzima fenoloxidase e uma cápsula polissacarídica extracelular. Estas propriedades permitem a sua sobrevivência no interior do hospedeiro e constituem os mais importantes factores de virulência deste fungo (Chen *et al.* 1997).

Os componentes antigénicos da cápsula polissacarídica (Figura 1) têm permitido a classificação tradicional desta levedura basidiomiceta em três variedades, com cinco serotipos: var. *grubii* (serotipo A), var. *neoformans* (serotipo D), estirpes híbridas (serotipo AD) e var. *gattii* (serotipos B e C). Todavia, principalmente com base na análise molecular, *C. gattii* foi mais recentemente classificado como uma espécie distinta (Li & Mody 2010). Para além dos quadros clínicos de infecção com estas espécies serem algo diferentes, estas também diferem a nível de propriedades

bioquímicas, de ecologia e de epidemiologia (Mitchell & Perfect 1995), constituindo, em conjunto, o actual complexo de espécies de *C. neoformans*. Deste modo, neste trabalho passará a ser utilizada a designação “*C. neoformans*” como referência ao complexo *C. neoformans/C. gattii*.

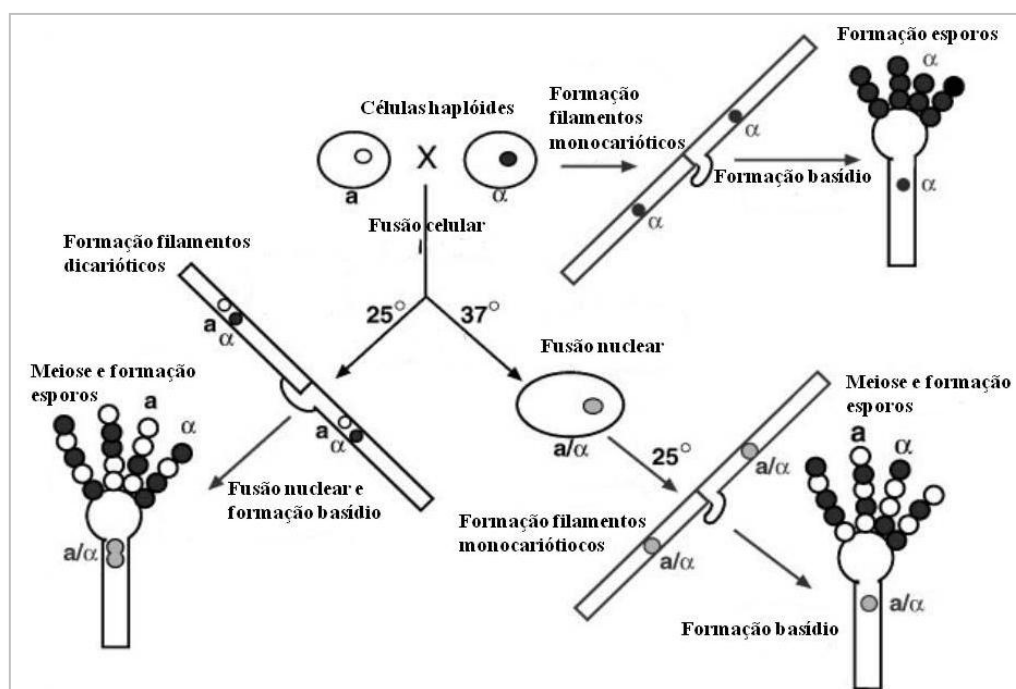


**Figura 1.** Preparação com tinta-da-China para visualização da cápsula polissacarídica de *C. neoformans* (Ellis *et al.* 2007).

As estirpes destas espécies têm mostrado suportar temperaturas mínimas e máximas óptimas de crescimento, entre 32 e 40 °C, respectivamente. Contudo, entre as várias estirpes e variedades do complexo de espécies de *C. neoformans*, verifica-se que a tolerância a altas temperaturas pode variar. Por exemplo, *C. neoformans* var. *grubii* geralmente tem melhor tolerância a temperaturas mais elevadas do que *C. neoformans* var. *neoformans*. Este facto é interessante visto que esta última variedade é frequentemente encontrada no Norte da Europa, por ser geralmente menos apta às altas temperaturas dos trópicos e áreas próximas do equador. Contudo, pode haver sobreposição entre estirpes individuais e variedades no que respeita à termotolerância, pelo que esta característica fisiológica não é distintiva entre variedades (Perfect 2006).

Aparentado com fungos superiores, *Cryptococcus* é uma levedura que raramente se reproduz sexuadamente, apesar de existirem livres na natureza dois *mating types*, *MATa* e *MATα*. Estes, quando cruzados em meio de cultura apropriado, dão origem a um basidiomiceta na sua forma perfeita (Hogan *et al.* 1996; Li & Mody 2010) denominado *Filobasidiella neoformans* (teleomorfo de *C. neoformans*) ou *F.*

*bacillisporus* (teleomorfo de *C. gattii*). O teleomorfo de *C. neoformans* foi descoberto há cerca de quatro décadas e envolve a fusão de células haplóides de *mating types* opostos, para produzir filamentos dicarióticos (Figura 2). Estes eventualmente levam à formação de basídios, nos quais a meiose ocorre para produzir basidiósporos. As leveduras do complexo *C. neoformans* podem ainda dar origem à formação de estirpes híbridas intervariedades (serotipos AD) e interespécies (BD e CD) (Lin & Heitman 2006).



**Figura 2.** Fases do ciclo de vida de *C. neoformans* (Adaptado de Hull & Heitman 2002).

Devido ao seu ciclo de vida, *C. neoformans* pode adoptar diferentes formas morfológicas na natureza (Lin & Heitman 2006). O seu ciclo de vida pode envolver crescimento vegetativo, como forma leveduriforme, combinada com a capacidade de adquirir formas filamentosas dimórficas transitórias quando ocorre reprodução sexuada (Hull & Heitman 2002). Os isolados clínicos apresentam células leveduriformes encapsuladas no hospedeiro infectado e em cultura (Lin & Heitman 2006). As colónias que crescem em meio de cultura são de cor branca ou creme e opacas, tipicamente mucóides, e a quantidade de cápsula está directamente relacionada com o grau de mucosidade das colónias (Mitchell & Perfect 1995). A forma leveduriforme é a forma

assexuada deste fungo que se reproduz por gemulação (Casadevall & Perfect 1998). Apesar de a informação sobre a forma como *C. neoformans* existe nos isolados ambientais do ar, solo, ou árvores ser reduzida, acredita-se que a par de formas anamórficas (leveduras), podem existir, em grande parte, sob a forma de basidiósporos, forma sexuada ou forma perfeita. As diferentes morfologias, tanto leveduras como basidiósporos, são propágulos infecciosos de *C. neoformans* e crê-se que tenham um importante papel na virulência deste fungo (Casadevall & Perfect 1998; Lin & Heitman 2006). Apesar das duas espécies do complexo serem semelhantes na sua forma de levedura ou estado anamórfico, existem diferenças fenotípicas no estado teleomórfico: os basidiósporos de *C. neoformans* são esféricos, ovais, elípticos ou cilíndricos, com paredes finamente rugosas, enquanto os de *C. gattii* são baciliformes e de parede lisa (Casadevall & Perfect 1998).

*C. neoformans* é um fungo basidiomiceta, pertencente à classe *Hymenomycete* e à sub-classe *Tremellomycetidae*. Na ordem *Tremellales* e na família *Tremellaceae* estão incluídos muitos fungos parasitários, bem como as restantes espécies de *Cryptococcus* (Fell *et al.* 2000). *C. neoformans* é bastante distinto em termos evolutivos dos fungos ascomicetas, como a levedura modelo *Saccharomyces cerevisiae*, e de muitos outros fungos patogénicos para humanos, incluindo *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *Pneumocystis carinii*. Determinou-se, por exemplo, que *C. neoformans* e *S. cerevisiae* divergiram de um ancestral comum há cerca de 500 milhões de anos. Na realidade, *C. neoformans* é mais similar geneticamente a outros basidiomicetas, incluindo fungos patogénicos do milho e de outros grãos *Ustilago maydis* (Moore & Edman 1993) e *Ustilago hordei*, e cogumelos, como *Coprinus cinereus* e *Schizophyllum commune* (Hull & Heitman 2002).

*C. neoformans* é um agente patogénico oportunista, mas também pode ser um agente patogénico primário em pacientes sem debilidades aparentes no sistema imunitário. O conjunto de antifúngicos disponíveis para o seu combate tem sido limitado, e os efeitos secundários tóxicos e a emergência de resistência a drogas ainda são impedimentos importantes para uma terapêutica efectiva (Hull & Heitman 2002), factores que serão referidos adiante neste capítulo.

### 1.3 Ecologia e Epidemiologia das espécies do complexo *C. neoformans*

*C. neoformans* foi inicialmente isolado de amostras de sumo de pêssago por Sanfelice em 1894 (Li & Mody 2010). Posteriormente, Busse e Buschke isolaram-no a partir de uma lesão tibial de um paciente na Alemanha. Muitos dos primeiros casos relatados estavam associados a pacientes com cancro. Já em 1905, Von Hansemann apresentou o primeiro caso de meningite criptocócica (Mitchell & Perfect 1995).

Actualmente, sugere-se que as duas espécies do complexo, *C. neoformans* e *C. gattii*, estão presentes em nichos ecológicos separados (Lin & Heitman 2006). Tem sido descrito que a principal fonte ambiental de *C. neoformans* é o solo contaminado com fezes de aves, enquanto que os eucaliptos e a madeira em decomposição são o maior reservatório de *C. gattii* (Li & Mody 2010). Para além destes nichos, estas espécies ubiquitárias também são encontradas em frutos e vegetais, tendo também sido observada a sua presença em colónias de mel de abelha durante a estação de floração dos eucaliptos. Devido às fontes ambientais poderem abrigar mais do que uma estirpe de *C. neoformans*, parece plausível que as infecções iniciais possam ser causadas por uma mistura de estirpes. Contudo, a mais virulenta ou viável pode eventualmente ser predominante e causar criptococose quando a imunidade do hospedeiro é comprometida, ficando a sensação que a infecção possa ser realmente devida a apenas uma estirpe. As técnicas de rotina para tipagem dos isolados têm habitualmente baixa sensibilidade, pois a maior parte é feita a partir de uma ou duas colónias a partir da cultura de uma única amostra biológica. A continuação da vigilância dos múltiplos isolados de pacientes com criptococose com técnicas melhoradas, pode revelar que infecções mistas ocorrem com mais frequência do se pensa (Lin & Heitman 2006).

Tem sido documentado que *C. neoformans* causa também infecção numa grande variedade de hospedeiros mamíferos. As espécies mais comuns são gatos, cães, vacas, cavalos e primatas. Patologicamente, o local de infecção varia entre eles mas, sendo a criptococose uma doença fúngica disseminativa, envolve com frequência quase todos os órgãos do corpo. Nos gatos, por exemplo, é frequentemente localizada na zona nasal e/ou ocular e leva ao desenvolvimento de úlceras na cavidade oral (Casadevall & Perfect 1998).

As leveduras do género *Cryptococcus* são não fermentativas, são assimiladoras de inositol, e produtoras de urease. Para além de *C. neoformans*, pelo menos 38 outras espécies de *Cryptococcus* foram encontradas numa variedade de localizações ambientais. Algumas espécies revelam uma notável capacidade de adaptação ambiental a exposições rigorosas e variações climáticas amplas. Têm sido encontradas espécies de *Cryptococcus* na Antártida, a altas altitudes, como nos Himalaias, e em águas de elevada salinidade. Algumas espécies como *C. laurentii* e *C. humicolus* têm sido encontradas em alimentos, como fiambre e bacon curados devido à sua elevada composição lipídica. Apesar da capacidade de se adaptar a uma variedade de ambientes, a maioria das espécies do género não é capaz de sobreviver em tecidos de mamíferos, em consequência da temperatura elevada e do sistema imunitário dos hospedeiros (Casadevall & Perfect 1998). Por exemplo, *C. podzolicus* desenvolve uma cápsula e/ou produz melanina, factores de virulência importantes e referidos mais adiante no trabalho, mas não tem capacidade para crescer a altas temperaturas ambientais (35-40 °C) não provocando doença em mamíferos (Perfect 2006). Existem apenas alguns casos de *Cryptococcus* não *neoformans* que já causaram infecção em humanos, como *C. laurentii*, *C. curvatus* ou *C. albidus*. Foi descrito que os indivíduos contraíram a infecção frequentemente após exposição a estas espécies, que podem ser encontradas em ambientes aquosos, no solo, na pele humana e excrementos de aves. Deste modo, para todos os efeitos, *C. neoformans* e *C. gattii* são considerados como as únicas espécies causadoras de criptococose (Casadevall & Perfect 1998).

Devido às acentuadas diferenças moleculares, apoiadas por diferenças na epidemiologia, distribuição e habitats ambientais e características bioquímicas, em 2005 foi proposto que a até então a variedade *gattii* fosse reclassificada como uma espécie diferente de *Cryptococcus* (Hull & Heitman 2002), passando a ser classificada como *Cryptococcus gattii*, uma espécie filogeneticamente muito próxima (Lin & Heitman 2006). Por outro lado, as diferenças moleculares e de sequências genómicas levaram à detecção de variações genéticas significativas entre os serotipos A e D, que conduziram à diferenciação em variedades distintas, a var. *grubii* e a var. *neoformans* (Lin & Heitman 2006).

### 1.3.1 *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans*

*C. neoformans* var. *grubii* e var. *neoformans* causam cerca de 90% das infecções criptocócicas em hospedeiros imunocomprometidos, mesmo em áreas onde *C. gattii* é endêmico, correspondente à sua distribuição global no ambiente (Lin & Heitman 2006; Osuna *et al.* 2008). Apesar de *C. neoformans* var. *grubii* e var. *neoformans* serem mais frequentemente isolados a partir de solo enriquecido com fezes de aves, estes também têm sido encontrados no ar (Lin & Heitman 2006), e em madeira em decomposição de algumas espécies de árvores (Meyer *et al.* 2003), em alguns casos sozinhos, outros em conjunto com *C. gattii*, podendo estas espécies filogeneticamente próximas interagirem no seu ciclo de vida na natureza (Lin & Heitman 2006). Apesar de *C. neoformans* se desenvolver mais facilmente em componentes com elevadas percentagens de azoto, como excrementos de aves, estes animais não se infectam provavelmente devido à sua elevada temperatura corporal (40-42 °C). Contudo, as aves podem ser responsáveis pela disseminação desta levedura na natureza. Em áreas de nidificação de aves, as células leveduriformes possuem cápsulas quase inexistentes, apresentam-se desidratadas e facilmente são dispersadas através do ar (Mitchell & Perfect 1995). Há evidências de uma associação entre *C. neoformans* var. *grubii* e var. *neoformans* com determinadas espécies de árvores. Na realidade, estas duas variedades têm sido repetidamente isoladas a partir de madeira em decomposição de várias espécies de árvores, de diferentes regiões geográficas, onde a flora difere consideravelmente. De facto, a madeira em decomposição representa um dos principais nichos ecológicos desta levedura, o que é suportado pela produção acentuada da enzima lacase por *C. neoformans*. Esta característica é comum a outros fungos basidiomicetas que apresentam um papel importante na degradação da lenhina (Lin & Heitman 2006). Na realidade, na ordem *Tremallales*, da qual faz parte *C. neoformans*, estão incluídos fungos importantes presentes em madeira em decomposição (Harrison 2000). *C. neoformans* está potencialmente associado a hospedeiros ambientais heterólogos, como insectos e amibas do solo, pois a maioria dos fungos presentes nesta ordem são micoparasitários, o que apoia um possível papel parasitário de *C. neoformans* proveniente de fontes naturais (Lin & Heitman 2006).

Relativamente à capacidade infecciosa das duas variedades, *C. neoformans* var. *grubii* provoca a maioria das infecções criptocócicas (> 90%) e infecta



principalmente indivíduos imunocomprometidos. Já *C. neoformans* var. *neoformans* tem sido caracterizado como menos virulento e mais susceptível ao fluconazol do que *C. neoformans* var. *grubii* (Feng *et al.* 2008), sendo mais frequentemente isolado em países mediterrâneos, incluindo Portugal, e estando mais associado à ocorrência simultânea de manifestações cutâneas (Martins 2002).

### 1.3.2 *C. gattii*

Nas últimas décadas, tem sido dada maior atenção a *C. gattii*, devido à sua preferência pelos sistemas respiratório e nervoso em humanos imunocompetentes (Li & Mody 2010) e às infecções que tem causado em espécies de animais domésticos, como gatos, cães, cavalos e marsupiais (Sorrell *et al.* 1996). O menor número de casos de criptococose devido a *C. gattii* em pacientes imunocomprometidos continua ainda por explicar. Na realidade, esta espécie filogeneticamente tão próxima de *C. neoformans* causa infecções preferencialmente em indivíduos imunocompetentes, e é possível que esta esteja relacionada com o habitat ambiental restrito de *C. gattii* (Lin & Heitman 2006). Esta espécie tem sido isolada a partir de detritos de plantas de algumas espécies de eucaliptos (Lin & Heitman 2006), como *Eucalyptus camaldulensis* e *E. tereticornis* (Sorrell *et al.* 1996), *E. rudis*, *E. gomphocephala* e *E. blakelyi*, estabelecendo uma associação preferencial entre estes fungos e este tipo de árvores. Esta associação pode explicar a elevada prevalência de infecções por *C. gattii* entre os aborígenes australianos que vivem em zonas rurais onde estas espécies de eucalipto são comuns (Casadevall & Perfect 1998). Devido à maioria da população australiana infectada com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) viver em locais onde não existem árvores de eucalipto, a oportunidade de exposição a esta espécie é baixa. Na verdade, a maior parte dos casos de criptococose na Austrália têm ocorrido em indivíduos imunocompetentes em zonas onde existem estas árvores. A criptococose em coalas resulta frequentemente da exposição ambiental a esta espécie, pois estes marsupiais habitam árvores de *E. camaldulensis* (Casadevall & Perfect 1998). Contudo, ainda não há uma explicação para a distribuição mundial de *C. gattii*. Por exemplo, quase todos os casos de criptococose em Papua Nova Guiné são causados por esta espécie, todavia, nesse país as espécies de eucalipto são raras, sugerindo a existência de outros habitats naturais de *C. gattii* (Hull

& Heitman 2002). Diversos estudos sugerem a existência de outras fontes ambientais para além dos eucaliptos (Lin & Heitman 2006), tais como as espécies vegetais *Moquilea tomentosa*, *Cassia grandis*, *Ficus microcapra* e *Terminalia catappa* (Meyer *et al.* 2003; Kidd *et al.* 2001). Estes estudos indicaram uma associação específica entre os fungos e um conjunto diversificado de espécies vegetais hospedeiras que funcionam como nicho ecológico (Lin & Heitman 2006).

Comparativamente a *C. neoformans*, *C. gatti* causa quadros clínicos diferentes que incluem frequentemente criptocomas cerebrais e/ou pulmonares (Latouche *et al.* 2002). Em alguns estudos com animais, *C. gattii* mostrou ser menos virulento e invasivo do que as variedades de *C. neoformans* (Latouche *et al.* 2002), sendo também mais sensível às altas temperaturas: a 40 °C a maioria das estirpes morre em 24 horas (Mitchell & Perfect 1995). Tal como com *C. neoformans*, os isolados MAT $\alpha$  de *C. gattii* são mais predominantes, tanto em amostras clínicas como ambientais, especialmente nestas últimas. A par dos quatro tipos moleculares definidos por *C. gattii* pela técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), VGI e VGII têm uma ocorrência mundial, enquanto VGIII e VGIV estão restritos aos climas tropicais. As estirpes MAT $\alpha$  de VGII têm estado relacionadas com uma elevada incidência de infecções por *C. gattii*, de que é exemplo o surto ocorrido no ano 2000 na cidade de Vancouver (Canadá). Pensava-se inicialmente que *C. gattii* estivesse restrito a climas tropicais e subtropicais até ao aparecimento desse surto (Feng *et al.* 2008). Contudo esta espécie tem sido descrita um pouco por todo o mundo (Casali *et al.* 2003; Tay *et al.* 2006; Frasés *et al.* 2009; Li & Mody 2010).

Apesar de ter sido descoberto há mais de 100 anos, e de ter havido avanços significativos no conhecimento deste fungo, ainda há muito por esclarecer sobre o complexo *C. neoformans* (Li & Mody 2010). Torna-se assim importante saber mais sobre a epidemiologia da infecção criptocócica, a fim de conhecer melhor a ocorrência associada à patogénese das infecções, permitindo a avaliação do risco de infecção nas diferentes populações (Casali *et al.* 2003).

Avanços recentes têm levado ao desenvolvimento de *C. neoformans* como um excelente modelo genético para o estudo da patogenicidade fúngica. Entre múltiplas vantagens, realçam-se os factos de (i) *C. neoformans* ter um ciclo sexual bem definido, pelo que pode ser manipulado para estudos de genética, sendo esta facilitada pelo seu predominante estado haplóide, (ii) haver um fácil acesso a estirpes congénitas **a** e  $\alpha$ , (iii) já terem sido definidos diversos modelos animais, o que permite o estudo de cada fase da infecção e (iv) a possibilidade de se realizar a análise directa de estirpes mutantes. Ao longo dos últimos anos, já foram identificados cerca de 100 genes desta espécie, que permite a sua utilização em abordagens diversificadas (Hull & Heitman 2002).

### 1.4 Factores de virulência de *C. neoformans*

*C. neoformans* tornou-se um modelo atractivo para estudar a patogenicidade dos fungos. Em primeiro lugar, é um fungo patogénico primário que causa uma doença invasiva tanto em doentes imunocomprometidos como imunocompetentes, não só em humanos mas também em animais. Em segundo lugar, *C. neoformans* é um bom modelo para estudos de virulência a nível molecular, pois já se conhecem as características fenotípicas mais importantes associadas à capacidade deste organismo causar doença (Casadevall & Perfect 1998).

Os factores que tornam *C. neoformans* num importante agente patogénico podem ser divididos em dois grupos principais. O primeiro compreende as características básicas necessárias ao estabelecimento da infecção e à sobrevivência no hospedeiro humano, como a presença da cápsula polissacarídica, a capacidade de produzir melanina e o crescimento a 37 °C. O segundo grupo inclui características que contribuem para a virulência de *C. neoformans*, como a secreção de proteases, de fosfolipases extracelulares, a presença de *mating type*  $\alpha$ , a produção de urease e a produção de manitol (Casali *et al.* 2003).

A capacidade patogénica de *C. neoformans* depende de 3 factores principais: o estado imunitário do hospedeiro, a virulência das estirpes e a dimensão do inóculo. Devido à ubiquidade de *C. neoformans* na natureza e à relativamente baixa prevalência da infecção sintomática, a incidência da exposição excede muito a incidência da doença. A maioria das pessoas é naturalmente resistente, e apenas indivíduos com as defesas imunitárias comprometidas desenvolvem criptococose. Contudo, esta hipótese não explica a doença em indivíduos imunocompetentes. Foi sugerido que a doença pode ser iniciada em pessoas com defesas imunitárias normais, pela exposição de uma grande quantidade de inóculo (Mitchell & Perfect 1995).

Um factor de virulência tem como função aumentar a infecciosidade de um microorganismo ou a sua capacidade de superar as defesas naturais do hospedeiro. Para as bactérias patogénicas, existem estudos que descrevem uma variedade de factores de virulência, como factores de aderência, propriedades invasoras e toxinas. O actual conhecimento na área da bacteriologia está ao nível da compreensão dos mecanismos de acção dos genes envolvidos. Por outro lado, nos fungos, a identificação de certos

factores de virulência e dos genes envolvidos pode ser mais complexa e está menos definida do que em bactérias (Casadevall & Perfect 1998). Muitos factores de virulência podem ter surgido como um acidente da natureza pelo qual o fungo evoluiu, não para aumentar a sua virulência em hospedeiros mamíferos, mas sim a sua sobrevivência como saprófita ou como agente patogénico de plantas e animais. Contudo, outros factores de virulência, como o dimorfismo térmico, não têm qualquer função no ciclo de vida de um saprófita e aparentam ter evoluído a partir da necessidade de sobrevivência no organismo de hospedeiros mamíferos (Hogan *et al.* 1996).

A raridade do isolamento de *C. neoformans* como comensal em humanos, e da transmissão horizontal (pessoa-a-pessoa), sugere que a infecção humana é acidental e que não é necessária para completar o seu ciclo de vida. Neste contexto, é provável que os factores de virulência possam consistir num conjunto de traços que conferem ao fungo alguma vantagem na sobrevivência e multiplicação tanto no hospedeiro humano, como no ambiente (Harrison 2000; Casadevall & Perfect 1998). Por exemplo, a cápsula polissacarídica é antifagocítica, podendo proteger o fungo das amibas do solo e da desidratação. A habilidade de sobreviver sob um amplo intervalo de temperaturas (dos 0 aos 40 °C) permite a este fungo sobreviver em temperaturas extremas. A actividade fenoloxidásica e o seu produto do tipo melanina, protegem a levedura contra a radiação solar e os oxidantes ambientais. Para além disso, a actividade fenoloxidásica tem sido associada à colonização na madeira, pois esta enzima pode contribuir para a sobrevivência em habitats com madeira em decomposição. Outra característica deste fungo é a sua capacidade de sintetizar pigmentos escuros do tipo melanina quando cresce em meio contendo compostos fenólicos. Apesar de outros membros do género *Cryptococcus* produzirem pigmentos em substratos adequados, a formação de pigmentos por *C. neoformans* é mais rápida e intensa. Sabe-se que a produção de pigmentos está associada à virulência de *C. neoformans*, e nos últimos anos tem sido manifestado interesse nesta área para compreender a patogénese dos fungos e conceber novas drogas antifúngicas (Casadevall & Perfect 1998).

O *mating type* de *C. neoformans* pode ser igualmente um importante factor de virulência. O *mating type*  $\alpha$  representa 99,9% dos isolados clínicos e ambientais. *C. neoformans* é capaz de alterações fenotípicas *in vivo*, produzindo colónias mais gelatinosas *in vitro*, o que facilita a sua persistência nos tecidos. *C. gattii* é também

capaz de passar por variações fenotípicas que promovem a disseminação para o SNC. O mecanismo pelo qual as alterações fenotípicas aumentam a patogenicidade ainda não está completamente compreendido, embora se ponha a hipótese de ser devido à resposta inflamatória excessiva por parte do hospedeiro (Li & Mody 2010).

A invasão das células do hospedeiro por microrganismos implica a danificação do invólucro celular e posterior entrada nas células. Este processo de transmigração é mediado, muito provavelmente, por meios físicos e/ou enzimáticos. Os fosfolípidos e as proteínas representam os principais constituintes da membrana celular e os microrganismos capazes de produzir enzimas que os hidrolisem, tais como fosfolipases e proteinases, provocam a rotura das membranas durante a invasão da célula hospedeira. Clivando os fosfolípidos, as fosfolipases desestabilizam a membrana levando à lise da célula. Fungos patogénicos, como por exemplo *C. albicans*, secretam enzimas que são consideradas importantes na sua patogenicidade. Estas são categorizadas em dois tipos principais: proteinases, que hidrolisam pontes peptídicas; e fosfolipases, que hidrolisam fosfolípidos (Ghannoum 2000). Latouche e seus colaboradores (2002) observaram que a acção das enzimas secretadas por *C. gattii* era menor do que por *C. neoformans* var. *grubii*, sugerindo assim que a expressão do gene, a secreção de proteína e a actividade enzimática do produto do gene diferem entre as duas espécies. Contrariamente, a expressão de outros factores de virulência em *Cryptococcus*, como a produção de cápsula e melanina, são regulados pelas condições do ambiente (Latouche *et al.* 2002).

A resposta imunitária desenvolve-se como resposta a uma infecção, ou seja, à imunização dos produtos de *C. neoformans*, no sentido de conter e/ou erradicar a infecção. Os mecanismos imunitários são compostos pelas respostas humoral e celular. A primeira envolve a síntese de anticorpos a antígenos de *Cryptococcus*. A resposta celular produz linfócitos T que reconhecem os antígenos de *Cryptococcus*. A função e eficácia destes mecanismos específicos estão frequentemente ligadas intrinsecamente a, e dependentes de, mecanismos imunes não específicos como células fagocitárias e complemento. Historicamente, os mecanismos imunitários mediados por células têm sido considerados como a defesa imunitária primária específica contra *C. neoformans*. Contudo, há evidências de que ambos os mecanismos imunitários mediados por células e por anticorpos podem ter efeitos profundos no resultado da infecção, de que estes

mecanismos cooperam contra *C. neoformans* e de que cada resposta imune é mais eficaz na presença de outra (Casadevall & Perfect 1998).

*C. neoformans* tem diversos factores de virulência que operam em uníssono causando doença progressiva. No entanto, a severidade da doença no hospedeiro resulta da combinação de diversos factores de virulência com a condição imunitária do mesmo (Buchanan & Murphy 1998). Assim, a expressão de vários factores de virulência não está correlacionado entre eles. Tal como Clancy e seus colegas (2006) concluíram, não há correlação entre o tamanho da cápsula, a actividade das fosfolipases e a formação de melanina; os resultados sugerem que os factores do hospedeiro contribuem significativamente para a patogenicidade de *C. neoformans*. Apesar de haver diversos fenótipos de virulência associados a *C. neoformans*, os fenótipos mais conhecidos estão associados à formação de cápsula, produção de melanina e capacidade de crescer a uma temperatura de 37 °C (Perfect 2006), factores esses que, entre outros, serão desenvolvidos ao longo deste capítulo.

### 1.4.1 Cápsula

A característica mais distintiva de *C. neoformans* relativamente a outras leveduras medicamente importantes, é a presença de uma cápsula polissacarídica (Casadevall & Perfect 1998). Estudos com mutantes acapsulados evidenciaram a não virulência dos mesmos, enquanto que os isolados com cápsula exibiram diversos graus de virulência (Hogan *et al.* 1996; Buchanan & Murphy 1998). Sendo considerada um importante factor de virulência, esta tem sido estudada extensivamente (Casadevall & Perfect 1998).

A cápsula de *C. neoformans* é composta principalmente por polissacáridos de grande peso molecular, constituídos por unidades de  $\alpha$ -1,3-D-manopiranosose ligadas a resíduos simples de  $\beta$ -D-xilopiranosil e  $\beta$ -D-glucuronopiranosil. Este polissacárido é um glucuronoxilomanano (GXM) e possui os quatro serotipos já descritos anteriormente (Buchanan & Murphy 1998). Muitos estudos têm-se debruçado sobre a formação e constituição da cápsula sob o ponto de vista bioquímico, imunológico, biológico e, mais recentemente, genético. Através da análise da estrutura e síntese capsular por abordagens biológicas e bioquímicas, foi possível perceber como, e onde o material

para uma nova cápsula é formado. O material da cápsula sintetizado mais recentemente é depositado junto à parede celular, deslocando para o meio extracelular, o antígeno capsular mais antigo. (Hull & Heitman 2002).

O tamanho da cápsula polissacarídica varia consoante a estirpe de *C. neoformans* e as condições em que as células crescem. A maioria das células tem um diâmetro entre 4 e 10  $\mu\text{m}$ , embora algumas estirpes pouco encapsuladas possam ter um diâmetro de apenas 2 a 5  $\mu\text{m}$  (Casadevall & Perfect 1998). Em geral, as células de *C. neoformans* produzem uma cápsula densa quando se encontram em tecidos de mamíferos. Em meios de cultura artificiais, a densidade da cápsula é variável dependendo da estirpe (Hogan *et al.* 1996).

A morfologia da cápsula é usualmente observada por microscopia óptica de campo claro, contrastando a preparação com tinta-da-China. *C. neoformans* tem a capacidade de afastar as partículas deste composto dando origem ao aparecimento de um halo praticamente límpido em volta da célula (Hull & Heitman 2002). Além da microscopia, a sua presença também poder ser comprovada através de outras técnicas, nomeadamente, reacções capsulares resultantes da ligação de anticorpos a polissacáridos acídicos e imunofluorescência (Casadevall & Perfect 1998). As condições de crescimento da cápsula dependem das estirpes, mostrando a existência de variação fenotípica entre isolados de *C. neoformans*. Porém, a maioria das estirpes, mesmo aquelas que são pouco encapsuladas *in vitro*, desenvolve cápsulas maiores durante a infecção de um hospedeiro (Mitchell & Perfect 1995).

A cápsula tem várias funções na virulência de *C. neoformans*, incluindo a inibição da fagocitose e a sobrevivência intracelular em macrófagos após a fagocitose (Hull & Heitman 2002). O principal mecanismo pelo qual a cápsula de *C. neoformans* parece iludir as defesas do hospedeiro está relacionado com a existência de uma superfície não reconhecível pelos fagócitos (Hogan *et al.* 1996), inibindo assim a fagocitose e suprimindo a imunidade celular e humoral (Chen *et al.* 1997). As células encapsuladas de *C. neoformans* não são fagocitadas ou mortas por neutrófilos, monócitos ou macrófagos ao mesmo nível que os mutantes acapsulados. *C. neoformans* encapsulado tem uma superfície mais negativamente carregada que os respectivos mutantes sem cápsula ou, por exemplo, *S. cerevisiae*. A elevada carga negativa pode



causar uma repulsão electrostática entre o organismo e as células efectoras do hospedeiro (também carregadas negativamente), reduzindo as interacções célula-célula requeridas para a destruição de *Cryptococcus* (Buchanan & Murphy 1998). A cápsula é antifagocítica e interfere com a activação, maturação e processamento de antígeno de células dendríticas, e consequentemente, intervém com a função das células T. O GXM pode inibir directamente a proliferação destas células e, para além disso, o galactoxilomanano (GalXM) também presente, induz apoptose de células T humanas e, por esse mecanismo, inibem directamente a imunidade mediada por células. Assim, o GalXM e o GXM podem induzir a apoptose de macrófagos. Além destes mecanismos potenciais de evasão imunitária, a cápsula também contém manoproteínas, que são os maiores antígenos das células T que promovem a imunidade do hospedeiro (Li & Mody 2010).

Tem sido postulado que a cápsula de *C. neoformans* não só tem um papel importante como factor de virulência, como também permite a adaptação do fungo a condições ambientais adversas. Assim, foi demonstrado que, quando os nutrientes e a água são escassos, a síntese da cápsula é reprimida (Hogan *et al.* 1996). Contudo, sob condições limitativas de ferro ou concentrações elevadas de CO<sub>2</sub>, como as encontradas nos tecidos de um hospedeiro infectado, a síntese da cápsula é estimulada (Hull & Heitman 2002). Em condições arenosas, a cápsula hidrofílica colapsa e protege a levedura da desidratação (Hogan *et al.* 1996).

Já foi demonstrado que pelo menos quatro genes são essenciais para a formação da cápsula: *CAP59*, *CAP60*, *CAP64* e *CAP10*. Os mesmos, são igualmente responsáveis pela virulência e produção de efeitos imunossupressivos e propriedades antifagocíticas (Harrison 2000). Contudo, crê-se existir um conjunto mais numeroso de genes envolvidos na biosíntese capsular. Alguns já foram identificados, mas muitos ainda permanecem por descobrir (Hull & Heitman 2002).

### 1.4.2 Melanina

Uma das características que diferencia os isolados patogénicos de *C. neoformans* e os isolados não patogénicos de outras espécies de *Cryptococcus* é a capacidade de os primeiros formarem um pigmento de cor castanha a negra em meios de cultura que contenham componentes fenólicos. Este pigmento é um composto de melanina com actividade fenoloxidásica (Buchanan & Murphy 1998). A importância da produção de melanina na virulência deste organismo foi demonstrada inicialmente no início dos anos 80, com o trabalho de Rhodes *et al.* (1982). Os resultados mostraram que os mutantes de *C. neoformans* que não produziam melanina eram menos virulentos.

A síntese de melanina é catalisada pela ligação da fenoloxidase da membrana, com especificidade de substrato a compostos fenólicos que contêm grupos hidroxilo ou amina, como por exemplo, L-DOPA ou dopamina. Sendo o cérebro rico em substratos fenoloxidásicos, como a dopamina, este facto ajuda a explicar a propensão de organismos fenoloxidase-positivos para infectarem o sistema nervoso. Foi comprovado que a actividade de fenoloxidase é diminuída a 37 °C, comparativamente com 25 °C, concluindo-se que as células de *C. neoformans* se tornam menos susceptíveis aos efeitos fungicidas da luz UV. Isto sugere que a produção de melanina pode ter evoluído para proteger o fungo contra a radiação iónica e outras condições ambientais adversas (Hogan *et al.* 1996).

A melanina tem diferentes papéis na protecção deste fungo de importância médica em relação às defesas do hospedeiro. Jacobson e Tinnell (1993) concluíram, das suas experiências, que a melanina protegia *C. neoformans* de danos causados por hipocloritos e permanganato, mas não de peróxido de hidrogénio. Na realidade, *C. neoformans* tem capacidade de produzir níveis de melanina suficientes para se proteger dos compostos oxidativos produzidos pelos macrófagos. Além de actuar como antioxidante, a produção de melanina pode ajudar *C. neoformans* a sobreviver dentro do hospedeiro de outras maneiras. As leveduras melanizadas são menos susceptíveis à anfotericina B do que as células sem melanina, contribuindo assim para a diminuição da eficácia do tratamento das infecções em pacientes imunocomprometidos (Buchanan & Murphy 1998).

A melanina pode ainda actuar como factor de virulência, conferindo maior resistência ao fungo para ataques de leucócitos. Parece que pelo menos sete genes estão envolvidos na produção de melanina em *C. neoformans*, e que muitos deles têm efeitos na expressão de fenoloxidase (Hogan *et al.* 1996).

Além de induzir capacidades antigénicas, a melanina confere às células resistência físico-química à degradação. As suas propriedades redox permitem a neutralização de radicais livres. Estudos feitos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a melanina pode ligar-se a várias substâncias, como antibióticos e metais pesados, e a um elevado número de proteínas, bem como a péptidos anti-microbianos normalmente produzidos pelo hospedeiro. A lacase, produzida pelo gene *LAC1* (Hull & Heitman 2002), é requerida para produção de melanina. Esta enzima está quase exclusivamente localizada na parede das células do cérebro, sugerindo um papel importante durante a infecção deste órgão, colaborando para o seu neurotrofismo. No entanto, a melanina pode constituir um alvo terapêutico, pois foi demonstrado que os anticorpos contra a melanina inibem o crescimento *in vitro* de *C. neoformans* (Li & Mody 2010).

### 1.4.3 Temperatura

A capacidade que alguns fungos, incluindo *C. neoformans*, crescerem à temperatura corporal dos mamíferos, confere-lhes a capacidade de se tornarem patogénicos, e de invadirem e sobreviverem nos tecidos humanos. Contudo, a capacidade de resistirem a temperaturas elevadas, embora necessária, não é suficiente para se tornar num agente patogénico dos humanos (Perfect 2006).

Um factor de virulência pode ser definido de forma simples e clara, como sendo uma característica do fungo que aumente a sua capacidade de sobrevivência no hospedeiro (Hogan *et al.* 1996). Para causar infecção em humanos, *C. neoformans* tem de conseguir crescer a 37 °C, numa atmosfera com aproximadamente 5% de dióxido de carbono, e com um pH entre 7,3 e 7,4 (Buchanan & Murphy 1998). Estes factores de virulência permitem a qualquer fungo invadir os tecidos profundos e, no caso dos fungos dimórficos, estimular a transição para a forma parasitária (Hogan *et al.* 1996). A capacidade de *C. neoformans* crescer a 37 °C é considerada um importante factor de

virulência. Além disso, a dimensão compatível para a deposição alveolar é um factor de virulência de fungos adquiridos por inalação de esporos aéreos (Hogan *et al.* 1996).

No início dos anos 90, com o avanço da biologia molecular, foi possível identificar os genes que controlam a capacidade de crescer a altas temperaturas. O primeiro gene a ser estudado foi o da N-miristoil transferase (*NMT1*) em *S. cerevisiae*, verificando-se que na alteração de um aminoácido no gene *NMT1*, o mutante passou a ser avirulento (Perfect 2006). Outro gene que produz um fenótipo igualmente sensível à temperatura é o gene que codifica a calcineurina A (*CNA1*). A calcineurina é uma fosfatase específica da serina-treonina (*serine-threonine specific phosphatase*) formada por duas subunidades: a subunidade catalítica, calcineurina A; e a subunidade regulatória, calcineurina B (Buchanan & Murphy 1998; Perfect 2006). Estudos moleculares revelaram existir um papel importante da calcineurina, da proteína Ras1 e da quinase Ste20 $\alpha$  no crescimento a altas temperaturas e na virulência. A calcineurina é um alvo molecular de drogas imunossupressoras como a ciclosporina A (CsA) e a FK506. Ambas mostraram inibir o crescimento de *C. neoformans* a 37 °C mas não a 24 °C. A descoberta sugere que a calcineurina pode ser essencial para o crescimento a elevada temperatura e, consequentemente, para virulência. É interessante referir que a calcineurina revelou ser também indispensável para o crescimento de *C. albicans* a 37 °C ou 39 °C mas não tem qualquer papel na virulência desta espécie, revelando uma função distinta. Apesar de tudo, a calcineurina é um requisito básico para *C. neoformans* sobreviver no hospedeiro e, consequentemente, é um factor de patogenicidade importante (Buchanan & Murphy 1998; Perfect 2006). Para além destes genes, crê-se que cerca de outros 100 possam estar envolvidos na capacidade de alguns fungos crescerem a temperaturas mais elevadas (Perfect 2006). As espécies que tiverem a capacidade de colonizar e infectar tecidos humanos mas não forem capazes de crescer acima de 35 °C apenas conseguem causar infecções dermatológicas na pele, cabelo e unhas (Hull & Heitman 2002).

#### 1.4.4 *Mating type*

Nos anos 70, experiências sobre cruzamentos entre estirpes demonstraram que *C. neoformans* representa a forma anamórfica, assexual do basidiomiceta heterotálico, *Filobasidiella neoformans* (Mitchell & Perfect 1995). Nesses trabalhos verificou-se que a diferenciação de hifas em basídios com cadeias de esporos era muito semelhante à das restantes espécies do género *Filobasidium* (Hull & Heitman 2002).

*C. neoformans* é uma levedura basidiomiceta com um ciclo de vida envolvendo o cruzamento entre células haplóides *MATa* e *MAT $\alpha$*  (Liaw *et al.* 2010), com a formação de um estado diplóide perfeito, sendo que depois da meiose, os basidiósporos haplóides crescem sob a forma de típicas formas leveduriformes. Estes basidiósporos são considerados os propágulos infecciosos da criptococose, a partir de fontes naturais de vida livre, visto serem de tamanho reduzido (2 a 3  $\mu$ m), dimensões que favorecem a sua entrada e deposição nos alvéolos pulmonares (Harrison, 2000; Hogan *et al.* 1996).

Verificou-se que as células do *mating type* *a* respondem melhor a limitações de azoto, desidratação e a sinais de feromonas, bem como têm a capacidade de se diferenciar por um processo conhecido como frutificação haplóide, que envolve filamentação e esporulação (Hull & Heitman 2002). O *mating type* *a* é aproximadamente 30 a 40 vezes mais frequente (> 98%-99,9%) em ambos isolados clínicos e ambientais e tem sido definido como um importante factor de virulência deste fungo (Hogan *et al.* 1996; Buchanan & Murphy 1998; Casadevall & Perfect 1998; Lin & Heitman 2006). Uma hipótese para esta prevalência, é que as células *MAT $\alpha$*  ganharam vantagem ambiental devido à sua capacidade de frutificação haplóide, e que essa produção resultante de basidiósporos *MAT $\alpha$* , sendo mais elevada, leva a ocorrência de um maior número de infecções clínicas (Hull & Heitman 2002). Estudos de genética populacional indicam uma estrutura clonal, que pode ou não ter influência na desigualdade de ocorrência dos *mating types* (Casali *et al.* 2003). Tem-se verificado que alguns isolados *MAT $\alpha$*  de *C. neoformans* var. *neoformans* são mais virulentos em modelos animais que as estirpes *MATa*, e os isolados *MATa* de *C. neoformans* var. *grubii* revelaram maior capacidade de penetrar no SNC em estudos de coinfeção que as estirpes congénitas *MATa* (Lin & Heitman 2006).

Foram descritas diferenças entre os cruzamentos com diferentes serotipos de *C. neoformans*. O cruzamento é relativamente fácil entre estirpes de serotipos A e D mas não entre B e C. Sob condições mais restritivas estes serotipos podem cruzar e formar basídios e basidiósporos, e estes esporos são diferentes dos formados nos cruzamentos entre os serotipos A e D, tendo o estado sexual dos serotipos B e C sido designado por *Filobasidiella bacillispora* para reflectir a forma alongada dos esporos produzidos por estas estirpes (Hull & Heitman 2002).

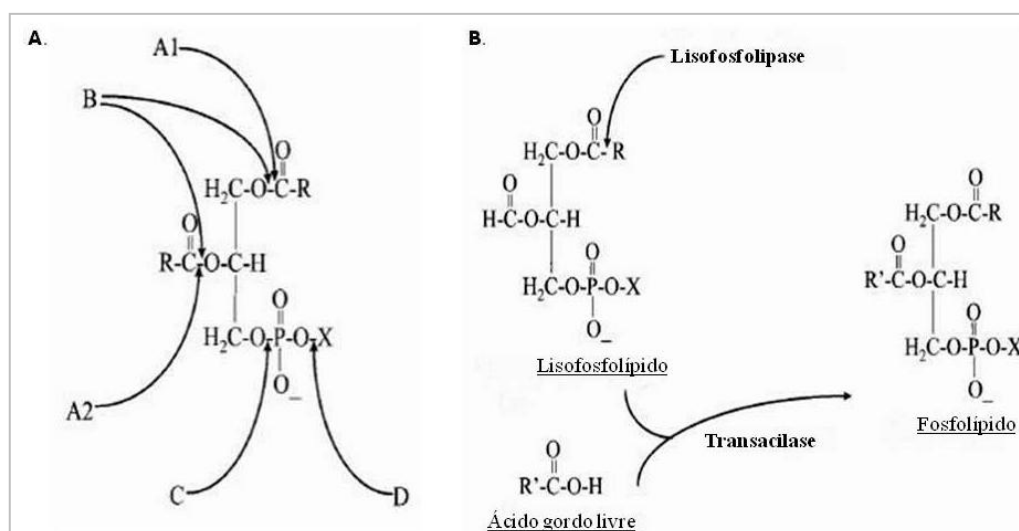
### 1.4.5 Fosfolipases

As fosfolipases extracelulares são produzidas por inúmeros microrganismos patogénicos ou não (Latouche *et al.* 2003), incluindo *C. neoformans*, embora sejam variáveis em natureza e quantidade, dependendo do isolado (Casali *et al.* 2003). Estão relacionadas com a patogenicidade deste fungo e, tal como as proteases, são determinantes na invasão de tecidos causando danos nas membranas celulares do hospedeiro durante a infecção criptocócica (Chen *et al.* 1997; Latouche *et al.* 2002, 2003). Estas enzimas hidrolisam os fosfolípidos na bicamada lipídica da membrana de células epiteliais e endoteliais (Latouche *et al.* 2002) e estão implicadas na alteração das propriedades físicas dos alvéolos pulmonares, visto que a fosfolipase B (PLB1) de *C. neoformans* prontamente cliva o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), o fosfolípido principal da superfície pulmonar (Ghannoum 2000). A exposição das membranas celulares dos alvéolos a esta enzima facilita a invasão dos tecidos pelo fungo. A confirmação experimental da produção destas fosfolipases é feita através de um método relativamente simples que permite verificar a produção de um precipitado de cor creme em volta das colónias de *C. neoformans*, quando usado um meio selectivo à base de gema de ovo (Ghannoum 2000), provando ser confiável, semiquantitativo e rápido (Chen *et al.* 1997).

Existem evidências que sugerem que a actividade das fosfolipases é um importante factor de virulência de *C. neoformans*. Primeiro, porque a maioria dos isolados exibe uma actividade fosfolipásica mais elevada do que a ureásica e a produção de melanina. Segundo, a elevada actividade das fosfolipases está relacionada com o aumento da aderência a células epiteliais pulmonares A549. Por fim, os danos na célula

provocados pela libertação de LDH (lactato desidrogenase), são mais frequentes nos isolados com elevada produção de fosfolipase. Contudo, estes dados necessitam de ser confirmados por experiências em animais e realizados ensaios com interacção com macrófagos (Liaw *et al.* 2010).

Este grupo heterogéneo de enzimas partilha a capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster em glicerofosfolípidos. Apesar do alvo de todas as fosfolipases serem os fosfolípidos, cada enzima tem a habilidade de clivar uma ponte de éster específica. Assim, a classificação com letras, como A, B, C e D (Figura 3), é usada para diferenciar a ponte alvo específica em cada fosfolípido (Ghannoum 2000; Cox *et al.* 2001).



**Figura 3.** Locais de acção de algumas fosfolipases. **A.** A1, fosforilase 1; A2, fosforilase 2; B, fosforilase B (PLB); C, fosforilase C (PLC); D, fosforilase D (PLD); **B.** lisofosfolipase e lisofosfolipase transacilase. (Adaptado de Ghannoum, 2000).

*C. neoformans* segrega a fosfolipase B1 (PLB1) que possui diversas funções. Tem actividade hidrolásica, pela qual liberta ácidos gordos a partir dos fosfolípidos; actividade lisofosfolipásica, libertando ácidos gordos ligados a lisofosfolípidos; e por fim, actividade transacilásica, que permite à enzima produzir fosfolípidos por transferência de ácidos gordos livres, para o lisofosfolípido. É provável que a actividade de degradação de fosfolípidos por PLB1 possa criar danos na membrana celular do hospedeiro levando à lise celular (Ghannoum, 2000; Noverr *et al.* 2003). Em experiências *in vivo* e *in vitro* verificou-se que PLB1 facilita a aderência ao epitélio

pulmonar, determinante para a infecção intersticial no pulmão, a sobrevivência e replicação de *C. neoformans* dentro dos macrófagos, e a disseminação no pulmão via sistema linfático e sanguíneo (Li & Mody 2010), embora não seja necessária para a sua sobrevivência nos pulmões (Noverr *et al.* 2003).

A compreensão do(s) mecanismo(s) envolvidos na contribuição das fosfolipases na virulência necessita igualmente de ser mais investigada, nomeadamente através da clonagem de genes e da purificação de enzimas. A purificação de fosfolipases fúngicas pode ajudar ao desenvolvimento de novos alvos antifúngicos. Porém, a purificação destas enzimas não é fácil pois são produzidas em pequenas quantidades e portanto, são necessários grandes volumes de meio de cultura para produzir a quantidade de proteínas necessárias ao estudo. Além disso, o elevado potencial lítico destas enzimas pode interferir com a purificação dos produtos dos genes. Os procedimentos de purificação podem ainda ser dificultados por outros constituintes dos organismos, como por exemplo, pelos constituintes da cápsula de *C. neoformans* (Ghannoum 2000).

O gene da fosfolipase B (*PLB1*), em comum com outros genes de *C. neoformans*, está presente num elevado número de intrões em todos os serotipos. O gene *PLB1* de *C. gattii*, serotipos B e C, apresenta uma extensa homologia com outros genes de *PLB* de outros fungos. O gene *PLB1* está localizado no menor cromossoma do serotipo A e no segundo menor dos isolados dos serotipos B, C e D. Parece existir apenas uma única cópia do gene, ou a existirem duas cópias, estas estão ligadas no mesmo cromossoma. A expressão de *PLB1* ao nível do mRNA nos serotipos B e C não parece ser regulada pela temperatura, pH ou disponibilidade de nutrientes no meio (Latouche *et al.* 2002).

Não há certeza de como as fosfolipases extracelulares estão envolvidas no crescimento de *C. neoformans* fagocitados mas, parece plausível que estas degradem as membranas dos fagolisossomas, libertando a levedura no citoplasma do fagócito. Cox e os seus colaboradores (2001) propuseram que as fosfolipases secretadas desempenham um papel patogénico nas infecções fúngicas, tanto a nível extracelular (lisando tecidos e superfícies) como intracelular (lisando compartimentos intracelulares das células fagocitárias).



A descoberta do facto das fosfolipases serem secretadas por diferentes géneros de fungos de importância clínica (*C. neoformans*, *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *A. flavus*) e o conhecimento de que estes fungos partilham a mesma classe de fosfolipases (como o PLB, por exemplo), sugerem que estas enzimas hidrolíticas podem vir a representar um potencial alvo terapêutico. Diversas abordagens no desenvolvimento de drogas medicinais podem levar à descoberta de novos agentes antifúngicos tendo como alvo as fosfolipases fúngicas. Estas abordagens incluem também o desenvolvimento de vacinas e a identificação de agentes que inibam a produção ou libertação de fosfolipases fúngicas. Tem sido também investigado o uso de fosfolipases como vacinas contra várias de doenças. Foram identificados inibidores de fosfolipases em *Candida*, usando substratos sintéticos destes em modelos *in vitro* e *in vivo*. Também já foram realizados estudos usando o gene *PLB* de *Candida* para testes de diagnóstico. A secreção de fosfolipases por fungos patogénicos pode representar um desafio ao desenvolvimento de testes de diagnóstico altamente específicos e sensíveis (Ghannoum 2000).

### 1.5 Importância clínica e manifestações da criptococose

A criptococose está entre uma das mais prevalentes infecções fúngicas e continua a ser uma causa significativa de morbilidade e mortalidade em todo o mundo. A sua prevalência é superior em pessoas com imunidade comprometida, apesar de haver casos de criptococose em hospedeiros imunocompetentes (Hogan *et al.* 1996; Lui *et al.* 2006; Meyer *et al.* 2003).

Antes do final da década de 70, a criptococose era raramente referida mas, a partir dessa época, tornou-se bem mais frequente. Em 1977, Kaufman e Blumer escreveram sobre a incidência ascendente da infecção criptocócica, chamando-a “*The awakening giant*” entre as micoses sistémicas. O aumento regular do número de casos reportados de infecção por *C. neoformans* depois de 1981 é provavelmente resultado da combinação de diversos factores. Melhorias no diagnóstico microbiológico, combinadas com a maior consciencialização da infecção, provavelmente contribuíram para o aumento dos casos descritos e um diagnóstico mais preciso. Nos anos 60, a disponibilidade de testes serológicos para detecção de polissacáridos capsulares facilitou muito o diagnóstico. Contudo, o factor mais importante que contribuiu para a ascensão das infecções criptocócicas pode ter sido o avanço no progresso médico, que resultou na sobrevivência prolongada dos doentes mesmo com imunidade enfraquecida (Casadevall & Perfect 1998).

O aumento na prevalência de infecções por *C. neoformans* foi paralelo ao aumento geral de todas as infecções fúngicas e à emergência de novos fungos patogénicos. A importância médica de *C. neoformans* aumentou drasticamente como consequência da epidemia da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) (Casadevall & Perfect 1998) que se tornou uma doença crónica em países desenvolvidos (Lin & Heitman 2006). A associação entre infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) e o aumento da susceptibilidade de infecção por *C. neoformans* disseminada ficou demonstrada desde o início da epidemia de SIDA. Dependendo dos estudos, estima-se que a frequência de criptococose em doentes com SIDA esteja entre 5 a 10%. A meningite criptocócica é a infecção fúngica mais comum que afecta o SNC e a terceira complicação neurológica mais frequente nestes doentes (Lin & Heitman 2006). Contudo, esta tem vindo a diminuir na última década nos países

desenvolvidos devido à introdução da terapêutica antiretroviral de elevada eficácia (HAART), no final dos anos 90 (Ghannoum 2000; Lin & Heitman 2006). No entanto, a frequência de casos de criptococose ainda é alta, principalmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, nomeadamente países da África Central (Ghannoum 2000; Osuna *et al.* 2008), e Sudeste Asiático (Lin & Heitman 2006), onde as possibilidades de recurso à terapêutica antiretroviral são escassas (Ghannoum 2000; Osuna *et al.* 2008). Nestas regiões, a meningite criptocócica é a causa de morte de mais de 30% dos doentes com este tipo de imunodeficiência (Lin & Heitman 2006). Com o declínio da incidência da criptococose relacionada com a SIDA numa época de grande utilização da terapêutica HAART, mas de aumento do uso de imunossuppressores, os indivíduos VIH-negativos (com ou sem factores predisponentes) podem tornar-se um grupo predominante de infectados (Lui *et al.* 2006).

Em alguns doentes, o uso da HAART no tratamento da infecção por VIH tem estado associado ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória contra infecções previamente identificadas ou subclínicas. O aparecimento de sinais inflamatórios e sintomas depois do começo da HAART tem sido chamado "*immune restoration disease*" ou síndrome inflamatório de reconstituição imune (SIRI). Os casos reportados de SIRI associados a *C. neoformans* têm envolvido culturas negativas, mas também incluem linfadenite, pneumonia necrotizante e criptococomas. Na ausência de profilaxia secundária ou de reconstituição dos sistemas imunitários, os doentes com SIDA que estão infectados por *C. neoformans* têm grande probabilidade de recaída. (Casali *et al.* 2003; Shelburne *et al.* 2005).

A criptococose ocorre globalmente, mas a grande maioria dos casos reportados são de países do hemisfério Norte, como os Estados Unidos da América (EUA) ou da Europa. Contudo, esta doença não deixa de ser um problema significativo em muitos outros países. Os conhecimentos actuais sobre a epidemiologia e patogenicidade da infecção resultaram de estudos comparativos sobre criptococose realizados em várias regiões geográficas (Casadevall & Perfect 1998).

Uma das questões fundamentais na epidemiologia da infecção criptocócica é o tempo entre a exposição ao agente e o desenvolvimento de sintomas clínicos. Este intervalo é muito variável. Tanto pode haver infecção aguda logo após intensa

exposição, como outros investigadores referiram reactivação de uma infecção subclínica latente adquirida muito antes das manifestações clínicas (Garcia-Hermoso *et al.* 1999; Harrison 2000).

Sendo que *C. neoformans* afecta indivíduos com várias características imunitárias (Lui *et al.* 2006), as doenças e terapêuticas que debilem os mecanismos imunitários do hospedeiro são factores de risco para a aquisição da infecção. Antes da epidemia de SIDA, os principais factores de risco da criptococose eram as doenças linfoproliferativas, corticoterapia e outras terapêuticas imunossupressoras, transplante de órgãos (Buchanan & Murphy 1998), diabetes, síndrome de Cushing, lúpus eritematoso sistémico e sarcoidose (Osuna *et al.* 2008). Desde 1981, o factor de risco mais comum tem sido a infecção por VIH (Casadevall & Perfect 1998) associada a linfócitos T CD4 em baixo número (Osuna *et al.* 2008).

Indivíduos imunocomprometidos são quase sempre infectados com *C. neoformans* var. *grubii* e desenvolvem doença, frequentemente manifestada como meningite. Pelo contrário, *C. gattii* tem propensão para indivíduos imunocompetentes e clinicamente as características da infecção grandes criptococomas pulmonares ou cerebrais (Casali *et al.* 2003).

*C. neoformans* também infecta animais domésticos e selvagens, contudo a transmissão da criptococose entre animais e humanos não tem sido documentada. As formas clínicas da criptococose em animais são frequentemente diferentes das que ocorrem nos humanos (Lin & Heitman 2006).

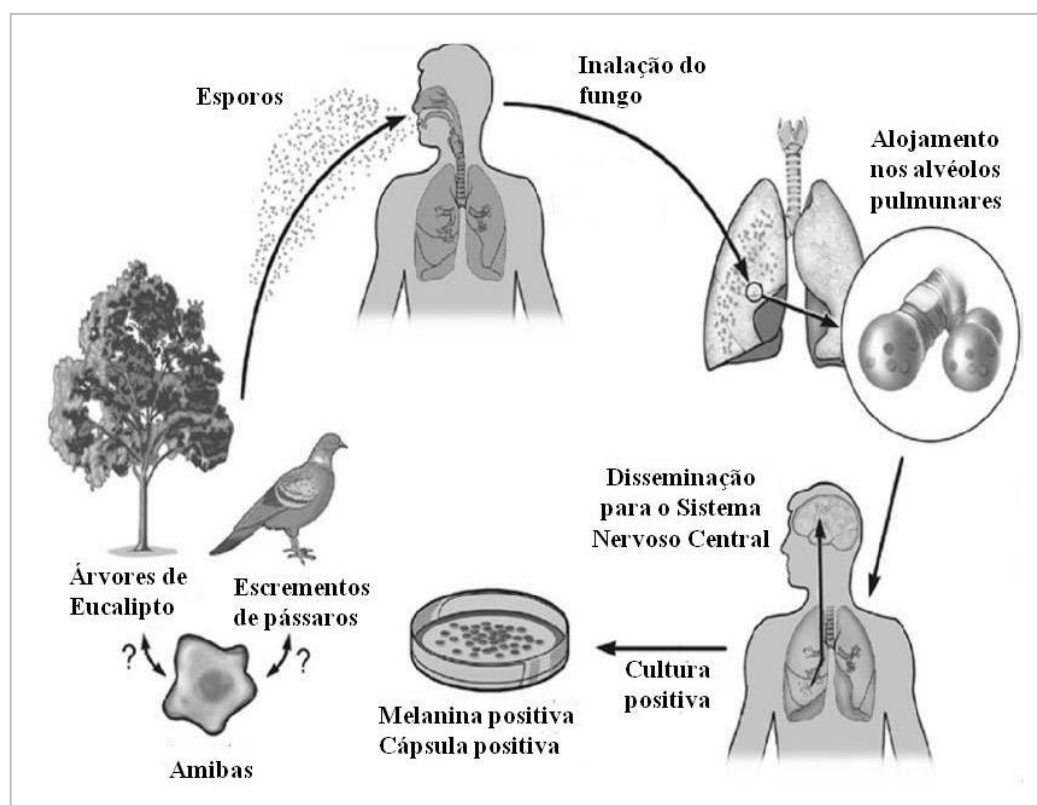
O prognóstico é determinado em função da severidade da infecção, do principal órgão envolvido, e do estado imunitário do hospedeiro. O sexo também pode ser um importante factor, já que vários estudos demonstraram que pacientes masculinos imunocompetentes são afectados mais frequentemente do que pacientes femininas imunocompetentes (proporção de 3,1:1), enquanto que a proporção masculino/feminino (1,3:1) é mais próximo para infecções envolvendo doentes imunocomprometidos. A influência do sexo é suportada por resultados obtidos em experiências em ratos, em que os animais do sexo feminino desenvolvem respostas imunitárias mais fortes a *C. neoformans* (Li & Mody 2010).

A elevada prevalência de *C. neoformans* na natureza e a relativamente baixa frequência de criptococose sugerem que muitas pessoas provavelmente são expostas sem desenvolver sintomas (Mitchell & Perfect 1995).

### 1.5.1 Modo de infecção

A patogenicidade da criptococose ainda não é totalmente compreendida, especialmente nos indivíduos imunocompetentes. Na verdade, todos os humanos são expostos a *C. neoformans* em algum momento da sua vida, sendo que na maioria dos indivíduos o sistema imunitário elimina rapidamente o organismo, tornando-se uma infecção assintomática, ou então estabelece-se uma infecção dormente, em forma latente, que poderá ser activada ao longo da vida, em resposta a uma imunidade mais fraca (Hull & Heitman 2002; Lin & Heitman 2006). Estes dados sugerem que a exposição e infecção são comuns em indivíduos saudáveis, apesar da doença ser relativamente rara (Li & Mody 2010). Porém, naqueles com funções imunológicas reduzidas, a forma latente pode ser reactivada e disseminar-se por via hematogénica, causando doença sistémica (Lin & Heitman 2006).

Tal como com outras infecções fúngicas, como a aspergilose, a histoplasmose e a coccidioidomicose (Lin & Heitman 2006), pensa-se que *C. neoformans* entra no hospedeiro através da via respiratória na forma de células desidratadas que, neste caso, são leveduras haplóides ou basidiósporos. Estes penetram nos alvéolos, aos quais podem aderir e ser internalizados por células epiteliais pulmonares (Figura 4). Uma vez dentro dos pulmões, a levedura rehidrata-se e desenvolve a cápsula polissacarídica característica. No caso dos basidiósporos, estes convertem-se em blastoconídios encapsulados (Buchanan & Murphy 1998; Cox *et al.* 2001; Li & Mody 2010).



**Figura 4.** Ciclo infeccioso de *C. neoformans* (Adaptado de Hull & Heitman 2002).

Os pneumócitos de tipo II revelaram ter *in vitro* o receptor para GXM. Estas células podem internalizar estirpes encapsuladas e não encapsuladas, bem como GXM purificado. A interação dos macrófagos alveolares com *C. neoformans* é vital no processo de disseminação pelo organismo. Por outro lado, *C. neoformans* produz uma proteína única, proteína antifagocítica 1, a qual inibe a sua fagocitose por macrófagos alveolares através da ligação de alguns receptores do complemento. Uma vez internalizado, o fungo é capaz de superar o ataque por via de replicação intracelular e acumulação citoplasmática de vesículas contendo polissacárido, levando à formação de fagossomas que contêm várias células criptocócicas. Após algum tempo nos pulmões, o microrganismo dissemina-se nos tecidos extrapulmonares por via hematogénica, sendo o cérebro o destino preferencial, onde causa meningoencefalite (Buchanan & Murphy 1998; Cox *et al.* 2001; Li & Mody 2010).

A acção ciliar do epitélio pulmonar tem a capacidade de remover partículas maiores que 5  $\mu\text{m}$ , como células leveduriformes encapsuladas, embora estas mostrem

pouca viabilidade sob condições de privação de nutrientes. Os basidiósporos por sua vez são do tamanho ideal ( $< 2 \mu\text{m}$ ) para penetrar e alojar-se nos alvéolos pulmonares. São mais resistentes à dessecação e são mais facilmente dispersos pelo ar. Por essa razão, pensa-se que os basidiósporos são considerados 100 vezes mais infecciosos do que as formas leveduriformes (Hull & Heitman 2002) e são a forma infecciosa que, após ser inalada, causa a criptococose (Lin & Heitman 2006). Contudo, as leveduras desidratadas em condições desfavoráveis em relação a nutrientes, perdem a cápsula e reduzem o seu tamanho para  $3 \mu\text{m}$  ou menos tornando-se suficientemente pequenas para se depositarem nos alvéolos pulmonares após inalação. Crê-se actualmente que as duas formas de *C. neoformans* podem ser a fonte de infecção pulmonar se o tamanho for o único factor determinante (Lin & Heitman 2006).

Os mecanismos pelos quais *C. neoformans* passa a barreira hematoencefálica são a chave para a compreensão do neurotropismo deste fungo. Logo após o início disseminação hematogénica criptococócica, ocorrem alterações morfológicas e funcionais na barreira hematoencefálica, resultantes da separação das junções entre células endoteliais, o que pode permitir a invasão do cérebro por via de espaços intercelulares (Lin & Heitman 2006). Estão propostos três modelos para explicar a transmigração entre a barreira sangue-cérebro. O primeiro, é explicado pela passagem transcelular através de células epiteliais. A membrana das células epiteliais torna-se rugosa e é induzida a formação de microvilosidades que envolvem as leveduras e as impelem para dentro da célula. Uma vez internalizado, *C. neoformans* atravessa as células epiteliais causando danos mínimos nas mesmas e acaba por ser exocitado no lado contrário através da superfície celular. Uma segunda hipótese refere um caminho paracelular entre as células endoteliais. *C. neoformans* interage com as células endoteliais, estas retraem-se e a junção é alargada permitindo a passagem do fungo. Por fim, é proposto um modelo “cavalo de Tróia”, segundo o qual os monócitos transportam *C. neoformans* no seu interior através dos vasos sanguíneos (Li & Mody 2010).

*C. neoformans* tem uma predisposição única para estabelecer infecção do SNC. A maioria dos pacientes (70 a 90%) apresentam sinais e sintomas de meningoencefalite aguda, como dor de cabeça, febre, apatia, letargia, náuseas, perda de memória, mudanças de personalidade, espasmos e/ou coma (Casadevall & Perfect 1998). Foram formuladas pelo menos três hipóteses possíveis para explicar o neurotropismo de *C.*

*neoformans*. Em primeiro lugar, a existência no SNC de substratos específicos neurológicos apropriados ao seu crescimento. Segundo, o SNC pode providenciar um refúgio para *C. neoformans* se proteger de respostas imunitárias do hospedeiro. Por último, a existência de receptores específicos nas células neurológicas que, durante a infecção sistêmica, atraíam células de *C. neoformans* mais avidamente do que outros órgãos. Na realidade, no SNC existem receptores fúngicos preferenciais. Os neurotransmissores como dopamina e epinefrina, podem ser usadas por *C. neoformans* para síntese de melanina, a qual protege as células fúngicas contra o *stress* oxidativo, a fagocitose, a acção de antifúngicos, e também modifica as respostas imunitárias do hospedeiro. As células fúngicas também podem ser sintetizar melanina nos pulmões, onde ocorre a infecção inicial (Lin & Heitman 2006).

Se não for tratada, a meningoencefalite criptocócica é 100% fatal. Mesmo havendo tratamento com antifúngicos eficazes, estas infecções podem ser fatais se o hospedeiro não tiver função imunológica adequada de células T-dependentes (Buchanan & Murphy 1998).

Apesar de muitas bactérias e fungos patogénicos adoptarem estratégias de sobrevivência dentro de macrófagos, estes agentes patogénicos oportunistas encontram-se maioritariamente no solo ou associados a plantas. Assim, impõe-se a questão de como é que os saprófitas desenvolveram mecanismos de sobrevivência em resposta ao sistema imunitário dos mamíferos. Uma possibilidade é que os mecanismos de defesa desenvolvidos por organismos como *C. neoformans*, para sobreviver em vida livre na presença de outros microrganismos, poderem ser usados como defesa às respostas imunitárias do hospedeiro (Hull & Heitman 2002). Tem sido proposto que a interacção de *C. neoformans* com amibas do solo no contexto de competição no ambiente, permitiu-lhe desenvolver estratégias para sobreviver dentro dos macrófagos. Macrófagos e amibas são similares em diversos aspectos, incluindo na capacidade de fagocitar partículas no interior de vacúolos e de digeri-los com enzimas secretoras. *C. neoformans* é de facto fagocitado pela amiba do solo *Acanthamoeba castellanii* e, uma vez dentro desta, multiplica-se e leva à morte da amiba (Steenbergen *et al.* 2001). Esta aparente estratégia de sobrevivência é muito semelhante à observada em macrófagos que fagocitam *C. neoformans*, o qual pode persistir no seu interior durante anos. Ao usar a amiba como um modelo comparativo para a sobrevivência nos macrófagos, foi



possível compreender o sucesso de *C. neoformans* como agente patogénico humano, e como se processa a fase latente da infecção (Hull & Heitman 2002).

### 1.5.2 Características clínicas

A infecção por *C. neoformans* pode estar associada a níveis menos severos de imunossupressão, incluindo esplenectomia, glomerulonefrite, cirrose, fascíte necrotizante, infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e até gravidez. Na verdade, as infecções incluindo meningite criptocócica, criptococoma cerebral, pneumonia e criptococose do cólon, embora mais raramente, também podem ocorrer em indivíduos saudáveis. Os órgãos afectados mais frequentemente são os pulmões e o cérebro, contudo já foram reportados casos de criptococose em outros órgãos, incluindo fígado, pénis, pele, próstata, tracto urinário, olho, miocárdio, ossos e articulações (Li & Mody 2010).

Embora sejam considerados o “portal” de entrada, os pulmões são o segundo local de infecção de *C. neoformans* mais relevante (Casadevall & Perfect 1998). Pacientes com doenças crónicas pulmonares, como bronquite e bronquiectasia, podem ter culturas positivas para *C. neoformans* durante muitos anos sem manifestações clínicas. Também podem ter sintomas de infecção de baixo grau (como tosse e febre), ou ainda desenvolver pneumonia (Li & Mody 2010). A pneumonia criptocócica pode variar desde uma infecção nodular assintomática, a um síndrome de dificuldade respiratória grave (Osuna *et al.* 2008). Em alguns casos, a criptococose pulmonar pode apresentar derrames pleurais, nódulo pulmonar maligno, ou lesão endobronquial, a qual mimetiza malignidade (Li & Mody 2010). A criptococose pulmonar também pode ser assintomática ou estar presente sem apresentar tosse, febre ou sintomas pleurais. A meningite é a característica mais comum da infecção, principalmente em pacientes VIH-positivos e em transplantados (Enoch *et al.* 2006).

O fígado também pode ser afectado em indivíduos imunocompetentes, apresentando icterícia obstrutiva associada à criptococose e peritonite criptocócica espontânea em doentes com cirrose no fígado. O diagnóstico nem sempre é claro, pois a infecção pode simular outras doenças, como colecistite, e levar à perfuração jejunal (Li & Mody 2010).

A criptococose primária da pele ou de tecidos moles é rara e pode apresentar-se sob a forma de lesões ulceradas. As infecções cutâneas secundárias ocorrem em mais de 15% dos doentes com criptococose disseminada. As lesões geralmente começam como pequenas pápulas que consequentemente ulceram, ou podem apresentar abscessos, nódulos eritematosos, celulite ou tumores sólidos. A infecção pode também manifestar-se de outras formas, como nódulos edematosos associados a febre. Estas manifestações são mais frequentes e severas após o transplante de órgãos, tratamentos prolongados com esteróis ou leucemia linfática crónica (Li & Mody 2010).

As características clínicas da criptococose humana podem variar dependendo do sistema imunitário do hospedeiro (Lui *et al.* 2006), assim como entre as espécies do complexo *C. neoformans* (Casadevall & Perfect 1998). A infecção nos imunocompetentes surge como uma infecção subclínica, localizada, e na maioria das vezes assintomática. Contrariamente, no doente imunocomprometido ocorre geralmente disseminação sistémica, com predilecção pelo SNC (Osuna *et al.* 2008). Comparativamente a *C. neoformans*, as infecções por *C. gatti* têm características clínicas diferentes, levando mais frequentemente ao desenvolvimento de criptocomas. Apresentam também uma susceptibilidade mais fraca a diversos agentes antifúngicos, o que provoca um prolongamento no tratamento e uma taxa de mortalidade mais elevada (Casadevall & Perfect 1998). Devido à variedade de sinais e sintomas, o diagnóstico clínico sem o diagnóstico laboratorial pode ser por vezes difícil (Hogan *et al.* 1996).

### 1.5.3 Tratamento

Devido à entrada pulmonar e à disseminação para o SNC, os objectivos dos tratamentos profiláticos são evitar a infecção dos pulmões e prevenir a disseminação hematogénea. Os casos mais graves correspondem aos de meningite criptocócica. O principal objectivo do tratamento consiste em erradicar as células de *C. neoformans*, minimizar as sequelas neurológicas e prevenir a morte do doente. O tratamento é optimizado em função de cada situação, mas em geral, baseia-se na combinação de anfotericina B, flucitosina e fluconazol (Li & Mody 2010). Devido à elevada taxa de recaída depois da terapêutica antifúngica inicial, o tratamento das infecções por *C.*

*neoformans* requer terapia supressiva com antifúngicos durante toda a vida (Ghannoum 2000).

Nas primeiras tentativas de tratamento da criptococose, as modalidades de tratamento eram amplas. Em *C. neoformans*, alguns dos mecanismos de resistência habituais, como a entrada e efluxo da droga e a actividade do alvo têm sido estudados. Alguns autores já referiram que as bombas de efluxo, como os transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), e as principais bombas facilitadoras, estão implicadas na resistência às drogas. Muitos dos estudos de resistência, têm-se focado no metabolismo da pirimidina e na síntese de ergosterol. O metabolismo de pirimidina é directamente afectado pela flucitosina, e a síntese do ergosterol é directamente activada por polienos e azóis. O ergosterol é essencial para a fluidez e integridade da membrana fúngica e para a função adequada de muitas enzimas ligadas à membrana, como a quitina sintetase mas, muitos dos mecanismo(s) de resistência têm-se desenvolvido em relação à síntese de ergosterol (Casadevall & Perfect 1998).

É necessário que haja por parte dos clínicos um elevado índice de suspeita de infecção, a partir de sintomas clínicos não-específicos, para que seja solicitado um exame laboratorial. Deve ser feita de imediato uma punção lombar para confirmar ou excluir a hipótese de infecção, pois um soro positivo para antígeno de *C. neoformans* é um resultado promissor para o diagnóstico desta infecção sistémica. A meningite criptococócica requer um tratamento agressivo e prolongado que deve ser iniciado o mais precocemente possível (Enoch *et al.* 2006).

Apesar do tratamento, a mortalidade de pacientes positivos para VIH é ainda elevada, pelo que são necessárias novas abordagens terapêuticas. A patogénese e as respostas imunitárias deste fungo continuam a ser alvo de pesquisa na tentativa de providenciar terapêuticas inovadoras (Li & Mody 2010).

### 1.6 Diagnóstico laboratorial convencional de *C. neoformans*

A partir de sinais e sintomas com ou sem exames radiológicos, o diagnóstico da criptococose deve ser confirmado pela detecção de antígeno, observação directa do fungo nas amostras clínicas e cultura do organismo, apoiado por exames histo e citopatológicos. Nos exames radiológicos mais comuns, observam-se cavidades parenquimais, nódulos e efusões pleurais. O isolamento de *C. neoformans* através da expectoração pode ajudar, mas não serve de diagnóstico, pois este organismo pode ser um saprófita de vida livre que tenha sido inalado. Apesar da detecção de antígeno ser indicativa, os clínicos devem ter presente que podem ocorrer resultados falsos-positivos e falsos-negativos (Li & Mody 2010).

A observação com tinta-da-China é um teste de diagnóstico particularmente útil e rápido para a meningite criptocócica (Osuna *et al.* 2008) em produtos como líquido cefalorraquidiano (LCR), biópsias, aspirados de lesões cutâneas e amostras respiratórias, mas não sangue (Mitchell & Perfect 1995). *C. neoformans* pode tornar-se frágil e colapsar quando seco ou fixo, mas através desta técnica as células encapsuladas são rapidamente distinguíveis. Este teste mostra ser positivo em mais de 80% dos pacientes com SIDA e em 30-50% dos pacientes sem a doença (Osuna *et al.* 2008). Apesar de simples e de custo baixo, a sensibilidade da observação por este método é baixa (Freydiere *et al.* 2001), entre 75-85% (Osuna *et al.* 2008).

Assim, um teste de aglutinação ou uma técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para detectar antígenos da cápsula criptocócica pode ser mais vantajoso. Em geral, o ELISA é realizado quando existe um elevado número de amostras para analisar (Freydiere *et al.* 2001), mas é preciso ter em consideração que em infecções agudas pode dar resultados falsos-negativos. A detecção de antígeno de *C. neoformans* nos testes de aglutinação no LCR apresenta uma sensibilidade de cerca de 95% (Osuna *et al.* 2008) e especificidade de cerca 93-100%. Para detecção de antígeno no soro, os *kits* que incluem um tratamento prévio com pronase mostraram ter resultados superiores (Freydiere *et al.* 2001). Contudo, o método-padrão (*gold standard*) para o diagnóstico definitivo de meningite criptocócica continua a ser cultura positiva do LCR para *C. neoformans* (Osuna *et al.* 2008).

Em geral, *C. neoformans* pode ser isolado em quase todos os meios bacteriológicos e micológicos de rotina, desde que sem a presença de cicloheximida, visto esta levedura ser susceptível a este antibiótico (Mitchell & Perfect 1995). Para a identificação convencional desta levedura ao nível da espécie, podem utilizar-se galerias com um conjunto de testes bioquímicos (API ID 32C<sup>®</sup>, BioMerieux, França), e sistemas comerciais automatizados (ex. VITEK<sup>®</sup>, BioMerieux, França ou MicroScan WalkAway<sup>®</sup>, Dade Behring Inc., EUA). Enquanto os primeiros permitem a identificação de cerca de 264 leveduras de importância clínica em 48-72 horas, incluindo isolados de *C. neoformans*, através da assimilação de diversos carboidratos e outros compostos (Szabó *et al.* 2008), os segundos identificam as leveduras mais comuns em poucas horas e permitem o processamento de elevado número de amostras num só dia (St.-Germain & Beauchesne, 1991).

O pigmento castanho-escuro produzido por *C. neoformans* em meio contendo substratos como ácido caféico, difenóis e aminofenóis, permite não só uma identificação presuntiva mas também um reconhecimento rápido em culturas mistas especialmente quando um baixo número de colónias está presente (Pincus *et al.* 2007).

### 1.7 Diagnóstico molecular de *C. neoformans*

Os primeiros estudos moleculares de *C. neoformans* foram feitos nos anos 60 e 70 e estavam focados em determinar o conteúdo G-C (guanina-citosina) do DNA e a proximidade filogenética dos DNAs entre as várias espécies de *Cryptococcus* por meio de reassociação DNA-DNA (Casadevall & Perfect 1998). Contudo, na última década, tem sido aplicado um diversificado número de métodos moleculares aos isolados desta levedura para estudo da sua epidemiologia. Entre estes incluem-se *Multilocus Enzyme Electrophoresis*, *Multilocus Sequence Typing* (MLST), sequenciação, cariotipagem, *Southern Hybridization* com sondas para genes específicos, *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *PCR-fingerprinting* e combinação de PCR com RFLP (PCR-RFLP). A maioria destas técnicas distinguem isolados individualmente mas têm algumas limitações em identificar serotipos e variedades ao mesmo tempo (Latouche *et al.* 2003; Meyer *et al.* 2003).

A tecnologia molecular também tem sido aplicada na identificação e diagnóstico de *C. neoformans* (Liaw *et al.* 2010) em amostras clínicas. Entre outras, a técnica de PCR tem sido usada para amplificar a porção de DNA ribossômico de *C. neoformans*. Ao produto amplificado pode ser aplicada a digestão por enzimas de restrição (Casadevall & Perfect 1998), sendo que a técnica de RFLP baseada num único gene, tem-se mostrado uma alternativa para fácil identificação, não só dos tipos moleculares, como do *mating type* das estirpes pertencentes às espécies do complexo de *C. neoformans*. Esta pode portanto ser uma ferramenta útil em microbiologia clínica e em estudos epidemiológicos desta levedura patogénica (Feng *et al.* 2008). A estrutura populacional dos tipos moleculares tem sido confirmada por análise de sequências e análise filogenética de diversos genes, como por exemplo, através dos genes da orotidina monofosfato pirofosforilase (*URA5*) e da fosfolipase B (*PLB1*) (Latouche *et al.* 2003; Meyer *et al.* 2003).

Através destas técnicas moleculares, os isolados clínicos e ambientais têm sido diferenciados em nove tipos moleculares (Tabela 1): os isolados do serotipo A produzem perfis dos tipos VNI, VNII ou VNB (até agora único no Botswana), e os

isolados do serotipo D produzem perfis VNIV, havendo híbridos entre as duas variedades de *C. neoformans* que produzem perfis VNIII (Lin & Heitman 2006).

Relativamente a *C. gattii*, os isolados do serotipo B apresentam perfis VGI e VGII, enquanto que o serotipo C apresenta perfis VGIII e VGIV (Lin & Heitman 2006).

**Tabela 1.** Serotipos e tipos moleculares correspondentes a cada espécie e variedade de *C. neoformans*. (Adaptado de Lin & Heitman 2006).

Espécies / Variedades	Serotipo	Tipo Molecular
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	A	VNI, VNII, VNB
<i>C. neoformans</i> (híbrido)	AD	VNIII
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	D	VNIV
<i>C. gattii</i>	B	VGI, VGII
<i>C. gattii</i>	C	VGIII, VGIV

No estudo de Bovers e seus colegas (2006) foi descrito pela primeira vez um híbrido entre *C. neoformans* e *C. gattii* (BD) que foi isolado de amostras clínicas. Estes autores valorizam o facto deste novo híbrido poder se tornar um “super-patogénio” com distribuição mundial, como *C. neoformans*, e infectando indivíduos imunocompetentes, tal como *C. gattii*, tendo assim graves implicações na saúde humana. Também o facto de ambos os híbridos conhecidos (AD e BD) terem em comum o serotipo D, sugere que este serotipo seja mais sexualmente compatível do que outros do complexo (Aminnejad *et al.* 2012).

O limite entre serotipos e tipos moleculares não é distinguível em todos os casos, principalmente entre os isolados de *C. gattii* (Boekhout *et al.* 2001; Lin & Heitman, 2006). Pensa-se que esteja a ocorrer evolução divergente entre os diferentes grupos, levando assim, à diferenciação de sub-genótipos, que são discordantes com o respectivo serotipo (Latouche *et al.* 2003).

### Plano da dissertação

Com o significativo aumento da importância das infecções causadas por *C. neoformans*, bem como a gravidade das proporções que esta pode causar, tornou-se de elevada relevância o estudo epidemiológico da mesma. Ao longo dos anos, também se tem verificado uma crescente taxa de resistência aos fármacos utilizados na terapia da doença. Havendo, no Laboratório de Micologia do IHMT, uma colecção de isolados clínicos e ambientais portugueses, de diferentes unidades hospitalares e fontes ambientais do país, abrangendo um período de tempo de cerca de 21 anos, tornou-se de extrema importância genotipar esses isolados e avaliar a sua susceptibilidade a certas drogas antifúngicas. Também fazem parte da colecção alguns isolados estrangeiros que foram recebidos ocasionalmente, para os quais se procedeu à mesma análise de modo a tentar compreender a epidemiologia da criptococose dos países de origem.

Neste âmbito, o presente trabalho tem como objectivos:

- ❖ Realizar a tipagem molecular dos isolados da colecção de *C. neoformans* através do método de RFLP do gene *PLB1*, a fim de caracterizar a ocorrência do agente etiológico da meningite criptococócica, e conhecer a epidemiologia desta infecção no nosso país;
- ❖ Avaliar a susceptibilidade dos isolados clínicos e ambientais aos antifúngicos, fluconazol e voriconazol, utilizando o método de difusão em disco Kirby-Bauer;
- ❖ Correlacionar os padrões de susceptibilidade relativos aos tipos moleculares encontrados.

Esta dissertação encontra-se dividida em quatro capítulos:

No primeiro capítulo, é feita uma introdução geral sobre a importância clínica das micoses humanas, realçando as características de *C. neoformans*, a sua ecologia e epidemiologia, bem como os seus factores de virulência. Também são referidas as manifestações clínicas da criptococose, o tratamento e mecanismos de resistência, e os



métodos convencionais disponíveis para a identificação bem como os testes moleculares utilizados na genotipagem deste agente etiológico.

No segundo capítulo, são descritos os métodos utilizados para diagnóstico convencional desta infecção (exame directo, cultura, pesquisa de antígeno e identificação bioquímica) e genotipagem do agente etiológico. Neste é referida como se avalia a qualidade do DNA a utilizar na amplificação e restrição do gene *PLB1*, tal como se procedeu a uma análise comparativa dos isolados estudados. É igualmente descrita a metodologia aplicada no estudo da sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos fluconazol e voriconazol, e a realização da análise estatística para correlacionar a susceptibilidade com os tipos moleculares.

No terceiro capítulo, são apresentados os resultados obtidos pelo trabalho realizado.

Por fim, no último capítulo, são discutidos os resultados e apresentadas conclusões e considerações finais, correlacionando os resultados obtidos neste trabalho com os de outros autores.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 2.1 Estirpes estudadas

Neste trabalho, foram estudadas 308 estirpes do complexo de espécies de *C. neoformans* pertencentes à colecção do Laboratório de Micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (IHMT-UNL). Desta colecção fazem parte 337 isolados de proveniência clínica e ambiental previamente identificadas através de métodos de diagnóstico convencional, bem como oito estirpes de referência obtidas da *Portuguese Yeast Culture Collection* (PYCC, Faculdade de Ciências e Tecnologia-UNL, Portugal), a qual inclui a estirpe tipo de *C. neoformans*, ou seja, a primeira a ser isolada, caracterizada e depositada numa colecção. Adicionalmente, também foram estudadas oito estirpes de referência representativas de cada tipo molecular (Tabela 2), de acordo com Latouche *et. al* (2003) e pertencentes à colecção do investigador Wieland Meyer (WM), do *Molecular Mycology Research Laboratory, Sydney Medical School-Westmead Hospital*, Austrália, igualmente depositadas na colecção holandesa da *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS-KNAW, *Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences*, Holanda).

Das estirpes estudadas, 255 correspondem a isolados clínicos obtidos a partir de amostras biológicas, maioritariamente de LCR (203) e de sangue (38), mas também a partir de, lavado bronco-alveolar ou LBA (três), biópsias cutâneas (três), biópsias de pulmão (uma), líquido ascítico (um), urina (uma) e de cultura obtida de produtos biológicos desconhecidas (cinco). Apesar de apenas alguma informação estar disponível, sabe-se que oito isolados são provenientes de pacientes VIH-negativos sendo que alguns deles também possuem factores de imunossupressão. Foram analisados 12 isolados recolhidos de doentes infectados por VIH, internados em Unidades de Infecçologia de diferentes hospitais, possuindo alguns deles factores de imunossupressão. Os isolados clínicos portugueses foram obtidos entre 1991 e 2012, a partir de produtos biológicos infectados originários de várias unidades hospitalares portuguesas, maioritariamente da região da Grande Lisboa. Apenas um isolado proveio dos hospitais Garcia de Orta (Almada), e de São Bernardo (Setúbal). Contudo, por serem casos únicos estes foram incluídos com os da região da Grande Lisboa. Também foram incluídos no estudo 41 isolados originários de duas unidades hospitalares da cidade do Porto e um do Hospital de Vila Real (Tabela 3).

Foram igualmente incluídos neste estudo 20 isolados ambientais obtidos a partir de fezes de pombo (16) e de material vegetal (quatro), colhidos em Lisboa (sete) e Vila Real (13), em 1997 e em 2007, respectivamente.

Foram também incluídos isolados clínicos ocasionalmente obtidos de produtos biológicos provenientes de outros países: dois isolados de pacientes da Guiné-Bissau, um isolado de Angola e dois isolados do Instituto Pasteur de Paris (França), os quais foram adicionados à colecção para estudo. Adicionalmente, também foram analisados 12 isolados ambientais originários da Austrália. As informações disponíveis sobre todos os isolados estudados estão apresentadas nas tabelas 13-17 (Anexo I).

**Tabela 2.** Estirpes de referência usadas, respectiva origem, tipo molecular e serotipo.

Estirpes de referência	Origem <sup>1</sup>	Tipo Molecular <sup>1</sup>	Serótipos <sup>1</sup>
<b>CN 133</b> (=PYCC 3529; CBS 880)	ND	ND	A
<b>CN 135</b> (=PYCC 3555; CBS 887)	Solo, Rússia	ND	A
<b>CN 136</b> (=PYCC 3534 ; CBS 879)	Úlcera humana, ND	ND	ND
<b>CN 137<sup>T</sup></b> (=PYCC 3957 <sup>T</sup> ; CBS 132 <sup>T</sup> )	Sumo de fruta fermentado	ND	D
<b>CN 138</b> (=PYCC 4208; CBS 6886)	Fezes de pombo, Dinamarca	ND	D
<b>CN 139</b> (=PYCC 5025; CBS 7747)	Eucalipto, Austrália	ND	B
<b>CN 149</b> (=PYCC 5026; CBS 7748)	Eucalipto, Austrália	ND	B
<b>CN 151</b> (=PYCC 5028; CBS 7750)	Eucalipto, EUA	ND	B
<b>WM 148</b> (=CBS 10085)	LCR (VIH+), Austrália	VN I	A
<b>WM 161</b> (=CBS 10081)	Árvore, EUA	VG III	B
<b>WM 178</b> (=CBS 10082)	Pulmão (VIH-), Austrália	VG II	B
<b>WM 179</b> (=CBS 10078)	LCR (VIH-), Austrália	VG I	B
<b>WM 626</b> (=CBS 10084)	LCR, Austrália	VN II	A
<b>WM 628</b> (=CBS 10080)	LCR (VIH+), Austrália	VN III	AD
<b>WM 629</b> (=CBS 10079)	Sangue (VIH+), Austrália	VN IV	D
<b>WM 779</b> (=CBS 10101)	Chita, África do Sul	VG IV	C

<sup>1</sup> Adaptado de informação retirada da base de dados das colecções PYCC e CBS; ND - não determinado;

<sup>T</sup> Estirpe tipo de *C. neoformans*

**Tabela 3.** Proveniência dos isolados clínicos portugueses estudados neste trabalho: região do país, unidades hospitalares e número de isolados.

Região	Unidade hospitalar	Número de isolados
<b>Grande Lisboa</b>	Hospital Santa Maria (HSM)	132
	Hospital Egas Moniz (HEM)	49
	Hospital Prisional de Caxias (HPC)	8
	Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT)	5
	Hospital de Cascais (HC)	4
	Instituto Português de Oncologia (IPO)	4
	Hospital Curry Cabral (HCC)	7
	Hospital Militar de Belém (HMB)	1
	Hospital Garcia de Orta (HGO)	1
	Hospital São Francisco Xavier (HSFX)	1
	Hospital de São Bernardo (HSB)	1
<b>Trás-os-Montes e Alto Douro</b>	Hospital de Vila Real (HVR)	1
<b>Porto</b>	Hospital de Santo António (HSA)	40
	Hospital de São João (HSJ)	1

Todos os isolados foram mantidos a cerca de -80 °C, em meio de Sabouraud com 50% de glicerol, sendo apenas cultivados em meio de Sabouraud agar aquando da sua utilização.

### 2.2 Identificação dos isolados por métodos convencionais

#### 2.2.1 Exame directo

As amostras foram observadas ao microscópio óptico, em montagem convencional em lâmina com tinta-da-China, para observação de leveduras capsuladas. Neste tipo de preparações, o corante não penetra na cápsula, a qual fica evidenciada por uma zona de cor clara em redor da célula leveduriforme.

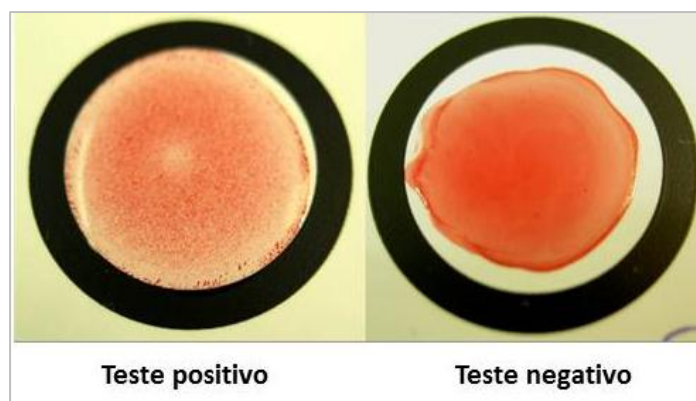
Numa lâmina de microscopia foi depositada, em cima de uma gota de tinta-da-China, uma gota do sedimento da amostra de LCR previamente centrifugada e coberta com uma lamela para observação ao microscópio óptico.

#### 2.2.2 Cultura

Todos os isolados foram crescidos em meio de Sabouraud agar em tubo com rolha de algodão, para evitar entrada de ácaros. As culturas foram incubadas à temperatura de 25 °C durante 3 a 10 dias. Para a realização dos métodos a seguir descritos, foram usadas culturas frescas com não mais de 4 dias e, quando necessário, estas foram repicadas.

#### 2.2.3 Pesquisa de antígeno de *C. neoformans*

A pesquisa de antígeno de *C. neoformans* é um teste presuntivo importante no diagnóstico da criptococose. Este procedimento foi realizado utilizando o *kit* comercial Pastorex Crypto PLUS® (Biorad Laboratories Inc., EUA). Este teste de aglutinação baseia-se na detecção qualitativa e semi-quantitativa da cápsula polissacarídica de *C. neoformans*, directamente no soro e no LCR. As partículas de latex são sensibilizadas com anticorpos contra antígenos da cápsula de *C. neoformans*. Quando o complexo latex/anticorpo entra em contacto com a amostra positiva, a reacção é comprovada pela aglutinação (Figura 5).



**Figura 5.** Teste de aglutinação com o *kit* Pastorex Crypto PLUS® (Biorad Laboratories Inc., EUA) para determinação da presença de antígeno capsular em amostras clínicas.

No cartão de aglutinação, colocou-se uma gota (aproximadamente 10 µl) da solução de latex incluída no *kit*, juntamente com 40 µl da amostra. Após uma agitação de 10 minutos à velocidade de 150 rpm, foi possível observar o resultado do teste. Paralelamente, foi realizado um controlo negativo, com uma amostra anterior, que já tinha sido identificada como negativa.

Sempre que o resultado for positivo foram realizadas titulações sucessivas até verificar ausência de aglutinação (1:10; 1:100; 1:1000). O título corresponde à máxima diluição que ainda apresentou esta reacção.

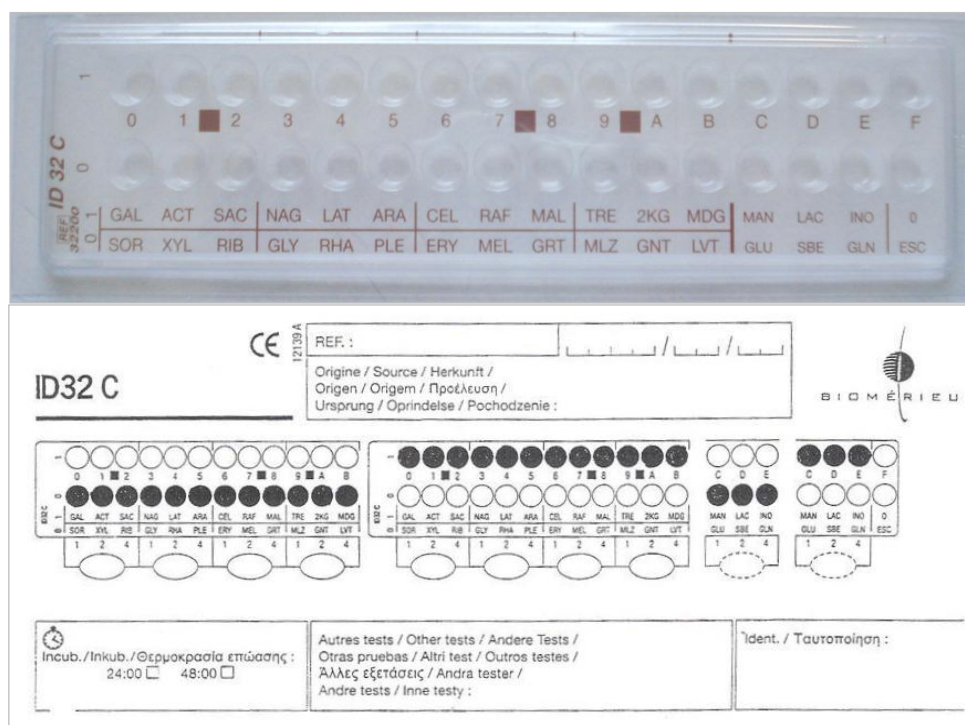
#### 2.2.4 Identificação bioquímica

A identificação de *C. neoformans* por métodos bioquímicos foi feita utilizando as galerias (adquiridas comercialmente) API ID 32C® (Biomérieux, França), no Laboratório de Micologia do IHMT, com a excepção dos isolados provenientes do HSM e IPO, onde a identificação das leveduras foi realizada usando o equipamento MicroScan Walkaway® (Dade Behring Inc., EUA). Este último é totalmente automatizado, completo e flexível usado em microbiologia clínica, permitindo obter resultados de um elevado número de amostras (até 96 de cada vez) num curto espaço de tempo (aproximadamente 4 horas). Este sistema avalia actividades enzimáticas usando maioritariamente substratos cromogénicos. Resultante das reacções bioquímicas, é



gerado num código numérico que é comparado com a base de dados para identificar os organismos (St.-Germain & Beauchesne 1991).

O sistema API ID 32C<sup>®</sup> possui 32 poços contendo diferentes substratos liofilizados como testes de assimilação (carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos), um teste de susceptibilidade (cicloheximida), um teste colorimétrico (esculina) e um controlo negativo (Ramani *et al.* 1998), tal como representado na Figura 6.



**Figura 6.** Kit comercial API ID 32C<sup>®</sup> (Biomérieux, França), para identificação bioquímica de leveduras.

No decurso do trabalho prático foi necessário confirmar a identificação de 11 isolados. Para a realização do teste, suspenderam-se algumas colónias de cultura recente em água bidestilada esterilizada, preparando uma suspensão de turvação correspondente a 2 na escala de McFarland. Retiraram-se 250 µl desta suspensão para a ampola de meio líquido, providenciada pelo fabricante, e homogeneizou-se.

Em seguida, distribuíram-se cerca de 135 µl dessa suspensão em cada poço do kit, que posteriormente foi fechado e incubado a 30 °C durante 48 horas. O resultado foi analisado observando a presença ou ausência de turvação em cada poço

correspondendo, respectivamente, a resultados positivos e negativos. Após converter o resultado num código numérico, a identificação do isolado foi obtida através do *software* do fabricante do sistema.

## 2.3 Genotipagem de isolados de *C. neoformans* por RFLP do gene *PLB1*

### 2.3.1 Extracção do DNA genómico de leveduras

O DNA de cada isolado foi extraído através do método das microsferas, adaptado, com ligeiras alterações, de Meyer e colaboradores (2003). Este método baseia-se em dois tipos de lise que permitem a ruptura da parede celular das leveduras e assim a obtenção do DNA genómico em elevadas quantidades: a lise mecânica, providenciada pelas microesferas de vidro, enquanto que, a lise química é provocada pelo tampão de lise.

A extracção foi realizada a partir de culturas frescas crescidas em meio de Sabouraud agar. Num tubo *ependorf* de 2,0 ml, contendo cerca 200 µl de esferas de vidro de 0,4-0,6 mm de diâmetro (Sigma-Aldrich, EUA), suspendeu-se uma porção abundante de colónia de levedura em 1,5 ml de água bidestilada Braun (B. Braun, Alemanha), e as células foram suavemente lavadas. Após centrifugar (Haraeus Biofuge Pico, Alemanha) durante 4 minutos a 13 000 rpm (16 089 g), o sobrenadante foi dispensado, e os tubos colocados a -20°C durante 1 hora. Adicionou-se ao sedimento 250 µl de TE fenol (Sigma- Aldrich, EUA), 250 µl de clorofórmio P.A (Merck, Alemanha) e 500 µl de Tampão de Lise<sup>1</sup>, o qual foi submetido à agitação máxima no vortex durante 20 minutos, seguido de centrifugação a 13000 rpm pelo mesmo período de tempo. Formam-se três camadas bem diferenciadas na solução: a primeira, o sobrenadante, contendo o conteúdo intracelular; a segunda camada é constituída por fragmentos de membranas, de parede e outros conteúdos celulares; e a última composta pelos componentes de lise (esferas de vidro, TE fenol, clorofórmio e Tampão de Lise). Cerca de 400 µl do sobrenadante foram adicionados a 1 ml de etanol 100% (BDH Chemicals, Inglaterra) e os tubos são colocados a -20 °C durante 30 minutos para precipitação do DNA. Centrifugou-se mais uma vez a 13 000 rpm durante 15 minutos, descartou-se o sobrenadante e, após secar à temperatura ambiente para remover o etanol, dissolveu-se o sedimento em 30 µl de TE 1x no “ThermoBlock” (Biosan, EUA) a 55 °C durante 15 minutos. Por último, os tubos foram guardados a -20 °C, condições nas quais o DNA mantém-se estável por um período de cerca de dois anos.

---

<sup>1</sup> (NaCl 250 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, SDS 0,3 % (p/v) a pH 8, e Triton X-100)

### 2.3.2 Análise da qualidade do DNA extraído

Com alguns isolados, o método de extracção acima descrito não permitiu obter DNA suficientemente puro para amplificação por PCR. Deste modo, os mesmos foram submetidos à análise da concentração e qualidade do material extraído por espectrofotometria, no equipamento Nanodrop<sup>®</sup> 1000, versão 3.7.1 (Thermo Scientific, EUA). Este instrumento faz a leitura da absorvância ( $A\alpha$ ) em diversos comprimentos de onda ( $A\alpha_{260\text{ nm}}$ ,  $A\alpha_{280\text{ nm}}$  e  $A\alpha_{230\text{ nm}}$ ). Os valores dos rácios  $A\alpha_{260\text{ nm}}/A\alpha_{280\text{ nm}}$  e  $A\alpha_{260\text{ nm}}/A\alpha_{230\text{ nm}}$  permitem avaliar o grau de pureza da amostra. Para considerar uma amostra pura, os valores indicados acima devem ser próximos de 1,8 ( $A\alpha_{260\text{ nm}}/A\alpha_{280\text{ nm}}$ ) e entre 1,8 - 2,2 ( $A\alpha_{260\text{ nm}}/A\alpha_{230\text{ nm}}$ ). Os valores mais baixos indicam a presença de proteínas, fenóis e outros contaminantes. A quantificação da concentração do DNA é lida num valor de absorvância a 260 nm e é calculada pelo *software* segundo a lei de Beer, sendo o valor ideal, de aproximadamente 50 ng/ $\mu$ l.

No programa informático do Nanodrop<sup>®</sup> seleccionou-se a opção “ácidos nucleicos” e “DNA-50”. Colocou-se 1  $\mu$ l do DNA da amostra no local indicado, baixou-se o manipulo do equipamento e anotou-se os valores das absorvâncias bem como os rácios  $A\alpha_{260\text{ nm}}/A\alpha_{280\text{ nm}}$ ,  $A\alpha_{260\text{ nm}}/A\alpha_{230\text{ nm}}$  e a concentração do DNA. Antes da leitura das amostras, bem como no final, fez-se uma leitura usando água Braun, a qual foi considerada o “branco” da medição, adoptando o mesmo procedimento realizado com as amostras. Entre a leitura de cada amostra limpou-se o equipamento com álcool para evitar leituras cruzadas.

### 2.3.3 Purificação do DNA

Com algumas estirpes, devido à dificuldade de obter material genético para a reacção de PCR, o DNA necessitou ser purificado, o que foi feito directamente a partir da solução de extracção. Na purificação, foi utilizado clorofórmio, que remove as impurezas, permitindo obter DNA mais puro.

Após a extracção mecânica e química, adicionou-se 100  $\mu$ l de clorofórmio P.A a 100  $\mu$ l de sobrenadante retirado da extracção de DNA. Agitou-se vigorosamente a solução durante 15 segundos e deixa-se repousar durante três minutos. Depois centrifugou-se a 7 000 rpm (4 665 g) durante 15 minutos, observando-se a formação de

duas camadas: o sobrenadante, onde está o DNA, e o sedimento composto por impurezas e clorofórmio. Foram retirados cerca de 50 µl de sobrenadante e adicionados a 100 µl de álcool isopropílico ou isopropanol (Sigma- Aldrich, EUA), homogeneizando cinco vezes por inversão e deixou-se repousar entre 10 a 15 minutos. Em seguida centrifugou-se novamente a 7 000 rpm durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, adicionaram-se 200 µl de etanol a 75% (BDH Chemicals, Inglaterra) e centrifugou-se uma última vez a 3 500 rpm (1 166 g) durante cinco minutos. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar o *pellet* à temperatura ambiente. Adicionou-se 30 µl de água bidestilada esterilizada Braun ao DNA, sendo este depois guardado a -20°C.

### 2.3.4 Preparação do DNA para PCR

Para utilizar o DNA extraído em reacções de PCR, foi feita uma diluição de 1:50 num volume final de 300 µl (294 µl de água bidestilada Braun e 6 µl de DNA). Esta foi conservada a -20 °C. Contudo, para algumas amostras nas quais se visualizava, após electroforese, uma banda muito ténue com a diluição 1:50, foram feitas diluições de 1:25 (288 µl de água bidestilada Braun e 12 µl de DNA) e 1:30 (290 µl de água bidestilada Braun e 10 µl de DNA), para a obtenção de bandas mais intensas.

### 2.3.5 Amplificação do gene *PLB1* de *C. neoformans*

Foram utilizados os *primers* descritos em Latouche *et al.* (2003) para a amplificação por PCR do gene *PLB1* de *C. neoformans* e *C. gattii*. A sequência dos mesmos é apresentada na Tabela 4.

**Tabela 4:** Sequência oligonucleotídica dos *primers* usados na reacção de PCR para amplificação do gene *PLB1* de *C. neoformans*. Dimensão do fragmento esperado ~1970 pb.

<i>Primers</i>	Sequência nucleotídica (5' -3')
<b>IDPLB1</b>	TGA GCT TCA GGC GGA GAG AGG TTT GG
<b>IDPLB1R</b>	AGG CTG GGT GGT GTT GTC GTC ACC

A reacção de amplificação foi adaptada a partir de Latouche *et al.* (2003), usando um volume final de 25 µl e de acordo com a Tabela 5.

**Tabela 5.** Mistura reaccional da reacção de PCR utilizada para amplificação do gene *PLB1* de *C. neoformans*.

Solução Stock	Concentração final	Volume por tubo (µl)
Água bidestilada	-	5,55
BSA 1 mg/ml	660 mg/ml	1,5
Tampão 10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3,5 mM	2,75
dNTPs 1,25 mM	250 mM	5,0
Mix Primers 5mM	0,8 mM	1,5
Taq polymerase	1 U	0,2
DNA	1:25/1:30/1:50	6,0

A reacção de amplificação foi realizada no termociclador *Tpersonal* (Biometra, Alemanha), nas condições expressas na Tabela 6.

**Tabela 6:** Programa de PCR utilizado para a reacção de amplificação do gene *PLB1* de *C. neoformans*.

Fase do PCR	Temperatura	Duração
Desnaturação Inicial	94 °C	3 minutos
Desnaturação	94 °C	45 segundos
35 ciclos Hibridação	56 °C	45 segundos
Extensão	72 °C	60 segundos
Extensão Final	72 °C	7 minutos

Os produtos de amplificação foram observados após electroforese com gel de agarose (Bioline, Inglaterra) a 1,5%, corado com brometo de etídio 2 µg/ml (Sigma-Aldrich, EUA). Os géis foram feitos com Tampão TBE 0,5x. Após polimerização dos mesmos, a cada 6 µl de amostra carregada no gel foram incorporados 3 µl de azul de bromofenol, formando uma solução azulada que permite melhor percepção da posição das amostras no gel. Foram também usados 6 µl de marcador molecular GeneRuler 100pb DNA Ladder Plus (Fermentas, Canadá) com uma diluição de 1:2. Os géis foram visualizados sob luz UV e as imagens captadas e registadas pelo sistema UVIDOC (Uvitec Cambridge, Inglaterra) depois de 30 minutos de corrida a 100 volts, em tampão TBE 0,5x.

### 2.3.6 Polimorfismos de restrição do gene *PLB1* de *C. neoformans*

A reacção de restrição dos produtos amplificados foi adaptada de Latouche e colaboradores (2003). A enzima de restrição *AvaI* (Biolabs, EUA) é utilizada neste estudo por reconhecer no DNA de *C. neoformans*, locais com sequências nucleotídicas variadas (Tabela 7), permitindo assim obter um padrão molecular com diversas bandas correspondentes a tipos moleculares distintos.

**Tabela 7:** Sequências nucleotídicas reconhecidas pela endonuclease *AvaI* e respectivos locais de restrição.

Sentido	Sequência nucleotídica <sup>1</sup>
5' – 3'	C <sup>▼</sup> YCGRG
3' – 5'	GRGCY <sup>▲</sup> C

<sup>1</sup> “Y” corresponde a uma base C ou T; “R” corresponde a uma base A ou G

As condições do ensaio realizado estão representados na Tabela 8, para um volume total de 20 µl.

**Tabela 8:** Mistura reaccional da reacção de RFLP utilizada com o gene *PLB1* de *C. neoformans* amplificado por PCR.

Solução Stock	Concentração final	Volume por tubo (µl)
Água bidestilada	-	7,5
Tampão NEBuffer 4	10x	2,0
<i>Ava</i> I 10 000 U	10 000 U/ml	0,5
Produto PCR	-	10,0

O período de incubação foi de 3 horas ou *overnight* a 37 °C, visto a endonuclease *Ava*I possuir *star activity*, ou seja, a sua actividade pára ao fim do período mínimo de incubação e o seu resultado não é modificado com o excesso deste. Os produtos de restrição foram separados por electroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio 2 µg/ml. À quantidade total da reacção de restrição (20 µl) foram adicionados 4 µl de azul de bromofenol, e o tempo de corrida foi de aproximadamente 268 minutos a 50 volts. Foram usados como padrão, 6 µl de marcador molecular GeneRuler 100pb DNA Ladder Plus diluído de 1:2. Os resultados foram obtidos por observação sob luz UV e as imagens captadas pelo sistema UVIDOC.

### 2.3.7 Análise comparativa

Para análise dos resultados obtidos por restrição enzimática, utilizou-se o programa informático GelCompar II<sup>®</sup> versão 1.01 (Applied Maths, Bélgica). Foi construída uma árvore filogenética constituída pelos isolados dos quais se obteve perfil molecular, com base no perfil de bandas obtidas por RFLP.

As afinidades entre as estirpes estudadas foram calculadas utilizando o coeficiente de Dice, que relaciona o número de bandas diferentes com o número total de fragmentos nos dois perfis (Garcia-Hermoso *et al.* 1999, 2001). Foi definida manualmente uma tolerância relativamente às bandas de 3,50%, dentro da qual o marcador molecular era reconhecido como sendo 100% idêntico. O mesmo valor foi utilizado na opção “*change towards end of fingerprint*”. O dendrograma foi gerado utilizando o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).



## 2.4. Estudo da sensibilidade aos antifúngicos pelo método de Kirby-Bauer

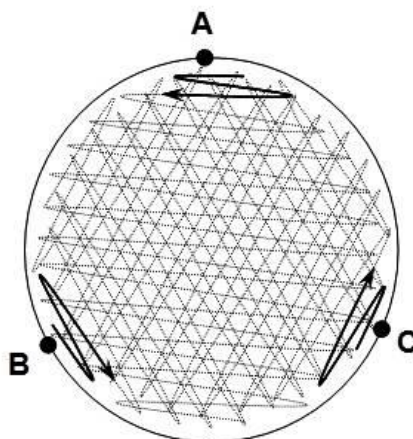
Os testes de sensibilidade aos antifúngicos foram realizados em 98 isolados, de acordo com a norma M44-A do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Foi utilizado meio de cultura Mueller-Hinton adicionado a 2% de glucose e 0,5 µg/ml de azul de metileno, para permitir uma melhor visualização e definição dos limites dos halos de inibição.

### 2.4.1 Preparação do inóculo

Foi preparada uma suspensão de algumas colónias frescas de leveduras em cerca de 1 ml de água bidestilada esterilizada, com uma turvação correspondente a 0,5 na escala de McFarland.

### 2.4.2 Inoculação das placas

Na suspensão que previamente foi suavemente homogeneizada no vórtex, foi imersa uma zaragatoa esterilizada, tendo o cuidado de retirar o excesso de inóculo da mesma. Com a zaragatoa humedecida, inoculou-se a superfície do meio, em três direcções diferentes e em estrias apertadas, de modo a cobrir homogeneamente a placa (Figura 7).



**Figura 7.** Método de inoculação da levedura no meio de cultura para a realização dos testes de sensibilidade aos antifúngicos com difusão a partir de disco (método de Kirby-Bauer).

O controlo de qualidade do teste foi feito utilizando o mesmo procedimento com a estirpe padrão de *Candida albicans* (ATCC 90028).

### 2.4.3 Aplicação dos discos antifúngicos

Para este estudo, utilizaram-se discos impregnados de fluconazol (25 µg) e voriconazol (1 µg) (Oxoid, Inglaterra). Antes da sua aplicação, esperou-se entre 10 a 15 minutos após a inoculação da suspensão na placa para que esta fosse absorvida pelo meio de cultura. Posteriormente, com uma pinça esterilizada, aplicou-se o respectivo antifúngico no centro da placa, pressionando-o ligeiramente contra a superfície do meio, de modo a assegurar o seu total contacto. As placas foram incubadas a 30 °C durante um período de 72 horas.

### 2.4.4 Leitura das placas

Após o período de incubação, observou-se a existência de zonas de inibição com diferentes diâmetros. O diâmetro dos halos de inibição e a respectiva concentração mínima inibitória (CMI) foram medidas e registadas pelo sistema informático BIOMIC Expert-System<sup>®</sup> (Giles Scientific Inc., EUA). A placa do controlo de qualidade foi lida antes de se iniciar a leitura das amostras a fim de calibrar o aparelho e validar o ensaio.

### 2.4.5 Interpretação dos resultados

Os valores do diâmetro dos halos de inibição, respectivas CMIs e classificação das estirpes ficam registados no sistema informático. As estirpes são assim classificadas segundo a categoria de *sensíveis* (S), quando a estirpe causadora da infecção pode ser inibida com a dose recomendada do agente antimicrobiano, *sensíveis dependendo da dose* (SDD), quando a sensibilidade da estirpe depende da concentração máxima possível de antifúngico a nível sistémico, e *resistentes* (R), quando as estirpes infecciosas que são inibidas pelas concentrações sistémicas que se obtêm após a administração do agente antifúngico (Tabela 9).

Segundo a norma M44-A, quando os valores da CMI se encontram no limiar entre duas categorias, deve-se classificar a sensibilidade do isolado na categoria superior.

**Tabela 9:** Valores padrão para leveduras, do diâmetro do halo da inibição e CMIs correspondentes, segundo a norma M44-A do CLSI (72 horas de incubação para *C. neoformans*).

Antifúngico	Quantidade de fármaco no disco (µg)	Diâmetro do halo de inibição (mm)			CMI equivalente (µg/ml)		
		R	SDD	S	R	SDD	S
<b>Fluconazol</b>	25	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 64	16-32	≤ 8
<b>Voriconazol</b>	1	≤ 13	14-16	≥ 17	≥ 4	2	≤ 1

### 2.5 Análise estatística

Foi realizada uma análise estatística dos resultados da genotipagem e respectiva susceptibilidade aos antifúngicos, usando o programa SPSS<sup>®</sup> (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 16.0 (IBM, EUA), recorrendo ao teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, também conhecido como teste de Mann-Whitney. As opções de análise descritiva e teste exacto foram seleccionadas. Considerou-se o teste bilateral, e só com valor- $p \leq 0,05$  se refutou a hipótese nula de não haver diferenças entre as CMI's dos tipos moleculares testados.

### **3. RESULTADOS**

---

#### 3.1. Estirpes estudadas

Foram estudados 308 isolados de um total de 337 pertencentes à colecção de *C. neoformans* do Laboratório de Micologia do IHMT. Estes foram recolhidos entre os anos de 1991 e 2012, contudo não foram estudados os isolados de 2005.

Os 255 isolados clínicos portugueses foram obtidos a partir de doentes com criptococose internados em hospitais de duas regiões do país: Grande Lisboa e norte do país (Porto e Vila Real), num total de 14 hospitais. Da região da Grande Lisboa foram estudados 213 isolados provenientes de 11 hospitais, dos quais a maioria veio do Hospital de Santa Maria (132 isolados), seguido do Hospital Egas Moniz (49), Hospital Prisional de Caxias (oito), Hospital de Cascais (quatro), Instituto Português de Oncologia (quatro), Hospital Militar de Belém (um), Hospital Garcia de Orta (um), Hospital São Francisco Xavier (um) e Hospital de São Bernardo (um). Outros cinco isolados são provenientes de uma antiga colecção do próprio Laboratório de Micologia do IHMT. Da cidade do Porto foram estudados 41 isolados, provenientes do Hospital de Santo António (40) e do Hospital de São João (um), bem como um isolado do Hospital de Vila Real.

Destes isolados, 90 fizeram parte de um processo de monitorização de 33 pacientes. Ao laboratório chegaram, para diagnóstico micológico, produtos biológicos do mesmo paciente ao longo de um período de tempo, ou produtos biológicos diferentes no mesmo dia, com o objectivo do clínico seguir o processo de infecção (Anexo II).

Quanto à proporção de cada género no total dos isolados clínicos, verificou-se uma grande ocorrência de estirpes originárias de pacientes do sexo masculino (84,9%) comparativamente às de sexo feminino (15,1%). É necessário referir que não foi possível aceder à informação relativamente ao sexo dos pacientes de onde foram isoladas as estirpes do laboratório de Micologia, os quais por essa razão, não estão incluídos nesta contagem.

Neste estudo, a média de idades dos pacientes foi de 37 anos, sendo amplo o intervalo de idades (entre os 19 e 85 anos). Em cerca de 13 isolados não foi registada informação sobre a idade dos indivíduos. O total de isolados dos quais se possui esse valor é somente 185.

Apesar de não se possuir informação completa sobre alguns isolados, confirma-se que alguns deles foram provenientes de pacientes infectados pelo vírus VIH, e um deles possuindo um outro factor de imunossupressão (tuberculose). Neste conjunto, existem oito isolados (CN 87, CN 88, CN 180, CN 187, CN 188, CN 189, CN 197 e CN 237) originários de cinco pacientes VIH-negativos, três deles com registo de factores imunossupressores (leucemia linfática crónica, diabetes, transplante renal ou outra patologia).

Relativamente aos isolados ambientais estudados, estes foram obtidos a partir de duas fontes ambientais, fezes de pombo e material vegetal, recolhidos em duas cidades portuguesas (Lisboa e Vila Real) nos anos de 1997 e de 2007 respectivamente.

Os isolados clínicos estrangeiros provenientes de Guiné-Bissau, Angola e Paris, pertencem na sua totalidade a indivíduos do sexo masculino com idades compreendidas entre 23 e 63 anos. Os dois isolados de Guiné-Bissau (1991 e 1992) provêm de pacientes distintos, com 27 e 36 anos de idade, o primeiro dos quais se confirmou estar infectado pelo VIH. A única estirpe de Angola pertencente à colecção, foi recolhida em 1995 de um paciente VIH-positivo com 23 anos de idade. Ambas as estirpes provenientes do Instituto Pasteur de Paris foram isoladas de pacientes com 32 e 63 anos, dos quais não se possui informação sobre o seu estado imunológico.

Foram igualmente analisadas 12 estirpes ambientais provenientes da Austrália, registadas no laboratório em 2000, e isoladas de fontes ambientais indeterminadas, com a excepção de um isolado (CN 150) do qual se sabe ser originário de matéria vegetal (eucalipto).

As oito estirpes de referência da colecção PYCC provêm de diversas origens. Cinco destas têm origem ambiental (solo, fezes de pombo e matéria vegetal, como o eucalipto), sendo provenientes de diferentes locais geográficos (EUA, Austrália, Dinamarca e Rússia). É de referir que não existe informação disponível sobre a origem do isolado PYCC 3529 (CN 133). Em relação ao isolado PYCC 3534 (CN 136), apenas se sabe que provêm de origem clínica (úlceras humanas) não se sabendo o país de origem nem mais informação clínica. A estirpe tipo de *C. neoformans* (PYCC 3957<sup>T</sup>) foi a primeira a ser identificada por Sanfelice em 1894, isolada de sumo de fruta fermentado. A maioria das estirpes de referência pertencentes à colecção holandesa CBS é de origem

clínica (LCR, sangue e pulmão) e provenientes da Austrália. Apenas um isolado provém de material vegetal indeterminado (árvore) dos EUA. É de também referir a peculiar proveniência de uma das estirpes (WM 779), isolada de uma chita da África do Sul.

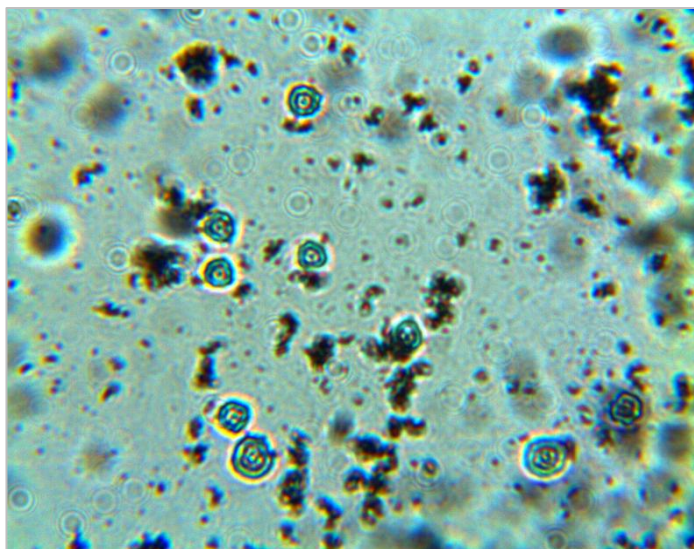


### 3.2 Identificação dos isolados por métodos convencionais

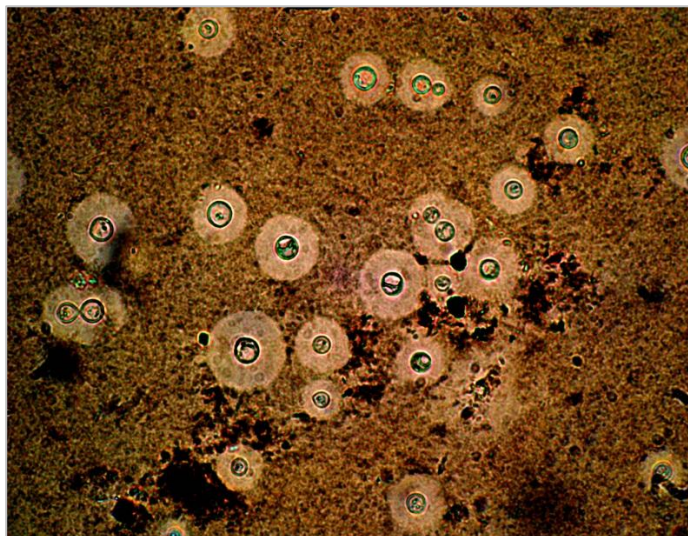
#### 3.2.1 Exame directo

No decurso deste trabalho, apenas uma amostra (CN 355) foi submetida a exame directo, visto ter sido a única amostra clínica positiva a chegar ao laboratório durante o período em que o trabalho prático desta tese decorreu (Figura 8). Com as restantes amostras da colecção, o exame directo foi realizado logo que iam chegando ao laboratório, de acordo com o protocolo de diagnóstico laboratorial da criptococose (Figura 9). Os exames directos a fresco foram realizados em todas as amostras clínicas à excepção das amostras de sangue.

As leveduras do complexo de espécies *C. neoformans* apresentam forma arredondada, sendo a sua cápsula evidenciada em forma de um halo claro em volta da célula leveduriforme.



**Figura 8.** Observação de *C. neoformans* (CN 355) em preparação com tinta-da-China (ampliação de 1500x).



**Figura 9.** Observação de *C. neoformans* (CN 276) em preparação com tinta-da-China (ampliação de 1500x).

### 3.2.2 Cultura

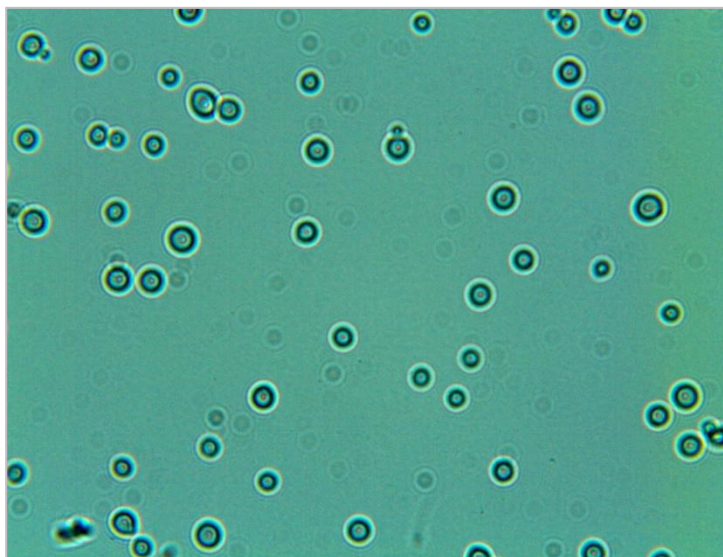
A vasta colecção de isolados de *C. neoformans* do laboratório, mantida a -80 °C em Sabouraud com glicerol, foi cultivada em meio Sabouraud agar para a realização deste trabalho. Alguns isolados só puderam ser recuperados a partir de outras cópias da colecção depositadas noutras instituições, pois os mantidos no IHMT não cresceram após várias tentativas de recuperação. Quatro dos isolados não cresceram definitivamente, deixando de fazer parte da colecção.

Todos os isolados que cresceram desenvolveram colónias de cor branca a creme, lisas e de secas a mucóides (Figura 10).

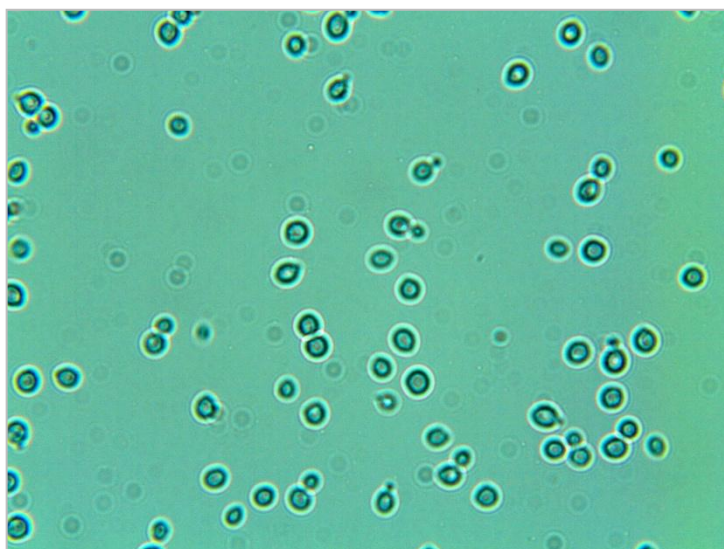


**Figura 10.** Observação macroscópica da cultura do isolado CN 220.

Observando microscopicamente as culturas, foi possível ver células leveduriformes esféricas ou ovais, de pequeno diâmetro. Algumas delas apresentavam-se em processo de gemulação, podendo eventualmente formar cadeias de duas a três células. Nunca se verificou a presença de pseudofilamentos nem verdadeiros filamentos nestes fungos. A cápsula polissacarídea apresentava-se como um halo de cor clara (Figuras 11 e 12), embora frequentemente seja muito reduzida ou quase imperceptível a partir de cultura.



**Figura 11.** Observação microscópica da cultura do isolado CN 22 (ampliação de 1500x).

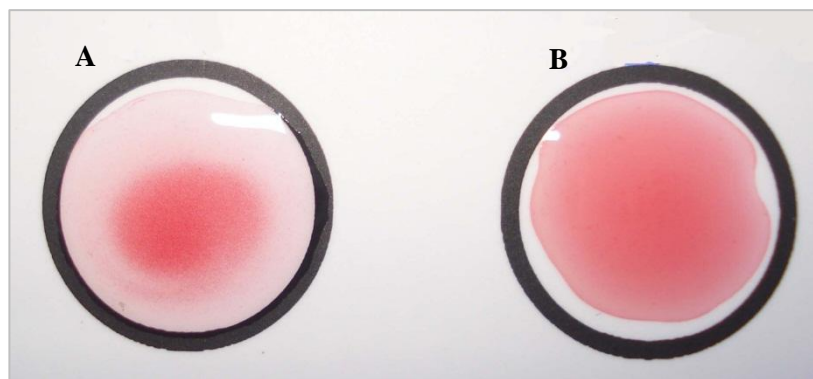


**Figura 12.** Observação microscópica da cultura do isolado CN 177 (ampliação de 1500x).

Observaram-se microscopicamente culturas de *C. neoformans* e *C. gattii*, e entre elas não se observaram diferenças morfológicas macroscópicas e microscópicas de realçar.

### 3.2.3 Pesquisa de antígeno de *C. neoformans*

Para complementar a informação do exame directo do isolado CN 355, realizou-se a pesquisa de antígeno circulante em LCR por teste de aglutinação. Como se obteve um resultado positivo na titulação inicial de 1:2 (Figura 13), realizaram-se diluições seriadas para o registo da máxima diluição que ainda apresentava aglutinação. No entanto, como as diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000 apresentaram resultado negativo, concluiu-se que o título de antígeno circulante na amostra era 1:2.



**Figura 13.** Resultado do teste de aglutinação com o *kit* Pastorex Crypto PLUS® (Biorad Laboratories Inc., EUA). **A.** O isolado CN 355 apresentou aglutinação. **B.** Controlo negativo do teste.

Nas restantes amostras, a pesquisa de antígeno foi realizada no dia em que foram processadas, à medida que iam chegando ao laboratório, de acordo com o protocolo de diagnóstico laboratorial da criptococose. Esses resultados são apresentados no Anexo I.

#### 3.2.4 Identificação bioquímica

Com os isolados da colecção que apresentaram sucessivos resultados negativos na extracção de DNA e amplificação do gene *PLB1*, foi realizada a identificação bioquímica através do sistema API ID 32C® que, como teste padrão, permitiu confirmar se se tratavam realmente de isolados de *C. neoformans*.

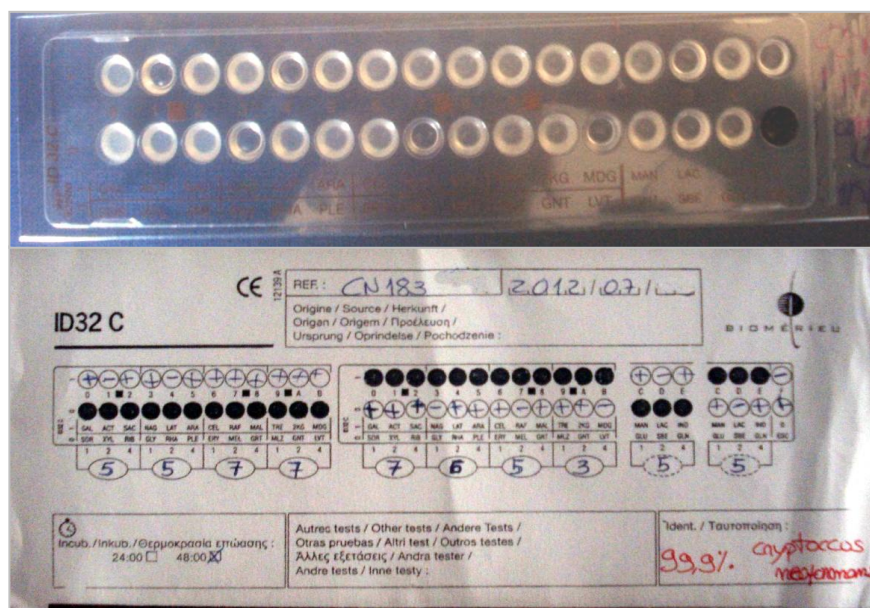
Apesar da maioria dos isolados apresentar características morfológicas semelhantes às leveduras de *C. neoformans*, o resultado dos testes bioquímicos revelou a presença de leveduras do género *Candida*. Na verdade, as colónias de algumas destas leveduras apresentavam uma consistência granulosa, não característica de *C. neoformans*, e o teste bioquímico confirmou tratarem-se de leveduras de *C. parapsilosis*. Relativamente aos isolados de referência, também uma das estirpes, a representativa do tipo molecular VG I (WM 179), já foi fornecida contaminada com *C. parapsilosis* (Tabela 10).



**Tabela 10.** Isolados para os quais se realizou o teste bioquímico e respectivo resultado.

Isolado	Resultado API ID 32C®
CN 8	<i>C. sake</i>
CN 13	<i>C. albicans</i>
CN 23	<i>C. parapsilosis</i>
CN 47	<i>C. parapsilosis</i>
CN 94	<i>C. parapsilosis</i>
CN 98	<i>C. parapsilosis</i>
CN 148	<i>C. guilliermondii</i>
CN 183	<i>C. neoformans</i>
CN 215	<i>C. parapsilosis</i>
CN 252	<i>C. glabrata</i>
CN 273	<i>C. parapsilosis</i>
WM 179	<i>C. parapsilosis</i>

Após a realização do teste bioquímico, confirmou-se que o isolado CN 183 era *C. neoformans* e que a cultura não estava contaminada por outra levedura, apesar de não se ter conseguido extrair o seu DNA (Figura 14).



**Figura 14.** Resultado do teste bioquímico realizado pelo sistema API ID 32C® (Biomérieux, França) com o isolado CN 183.

### 3.3 Genotipagem de isolados de *C. neoformans* por RFLP do gene *PLB1*

#### 3.3.1 Extracção do DNA genómico de leveduras

Foi extraído o DNA dos isolados analisados neste estudo pelo método das microesferas anteriormente descrito. No início do trabalho o método de extracção não incluiu um processo de purificação das amostras de DNA. No entanto, após se ter verificado uma maior eficiência na obtenção de DNA extraído com o método de purificação, passou a ser usado esse passo durante a extracção. Para confirmar a presença do DNA e a eficácia da extracção, foi realizada a reacção de PCR para amplificação do gene *PLB1*. Com alguns isolados, não foi possível obter produto amplificado na primeira reacção de PCR, tendo sido repetida a extracção de DNA num máximo de três vezes. No final, e para 19 isolados, a extracção não teve sucesso depois das tentativas sucessivas (Anexo I).

#### 3.3.2 Análise da qualidade do DNA extraído

Foi analisada a qualidade do DNA extraído, com e sem procedimento de purificação. As determinações foram feitas a partir do DNA puro e de diluições de 1:50 (Tabela 19, Anexo III).

Verificou-se que a concentração de DNA extraído era substancialmente mais elevada sem o passo de purificação (valor médio de 879,1 ng/μl). Essa concentração chegou a ser até seis vezes superior visto a média da concentração do DNA extraído com purificação ser 135,7 ng/μl.

A análise da qualidade do DNA permite saber a pureza da amostra. Este parâmetro é determinado pelo *software* do Nanodrop<sup>®</sup>, usando a razão de absorvâncias nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, a qual se deve aproximar de 1,8 para que a amostra seja considerada pura. Das 13 amostras analisadas, seis extracções sem purificação apresentaram valores considerados ideais, confirmando a pureza das mesmas. Por outro lado, nenhuma das 13 amostras extraídas com purificação apresentou valores próximos dos ideais.

O rácio  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  é utilizado como uma segunda medida de pureza dos ácidos nucleicos e deve situar-se entre 1,8-2,2 para a amostra ser considerada pura. Se a relação for inferior, pode indicar a presença de contaminantes que absorvam a  $A_{230\text{ nm}}$ . Onze das 13 amostras purificadas durante a extracção estavam dentro do intervalo de  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  requerido. Das extracções de DNA sem purificação, apenas em três se obtiveram valores dentro do intervalo.

Apesar da leitura dos valores no Nanodrop® ser validada usando o DNA bruto extraído, fizeram-se também leituras com diluições 1:50 para comparação. Como seria de esperar, o valor da concentração de DNA baixou significativamente em ambos os métodos, ficando em média em 27,3 ng/μl e 5,1 ng/μl para a extracção sem e com purificação, respectivamente.

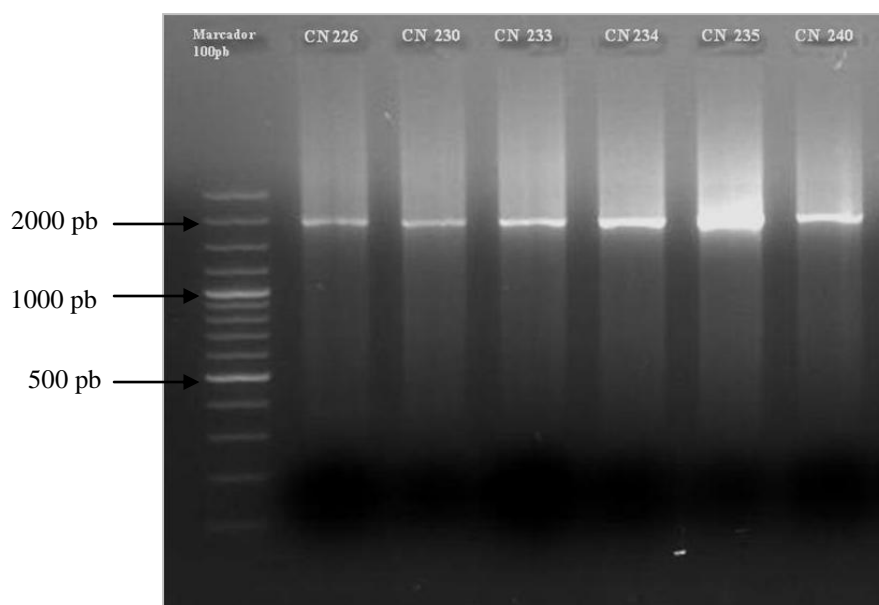
No caso das amostras não purificadas, observou-se uma diminuição nos valores do rácio  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  comparativamente às respectivas leituras com DNA puro, excepto com a amostra CN 212. Verificou-se o contrário com a razão dos comprimentos de onda  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ , excepto em relação ao DNA do isolado CN 320.

Os valores dos padrões de pureza do DNA obtidos pelos rácios  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  e  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  também diminuíram nos dois métodos, mas foram mais acentuadas nas amostras purificadas. Neste caso, com as amostras CN 69 e CN 127, o valor de  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  aproximou-se do valor de 1,8 (1,79 e 1,78, respectivamente), indicando uma maior pureza do DNA. Apenas com a amostra CN 194 verificou-se que a pureza da amostra se manteve a  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ , sem e com diluição.

### 3.3.3 Amplificação do gene *PLB1* de *C. neoformans*

Após a extracção do DNA foi realizada a reacção de amplificação do gene *PLB1* de *C. neoformans* com *primers* específicos em todas as amostras. A reacção foi considerada positiva após visualização de uma banda de dimensões aproximadas de 1970 pb (Figura 15). Em cada gel, foi usado o marcador de pesos moleculares de 100 pb, o qual permitiu determinar as dimensões das bandas obtidas.



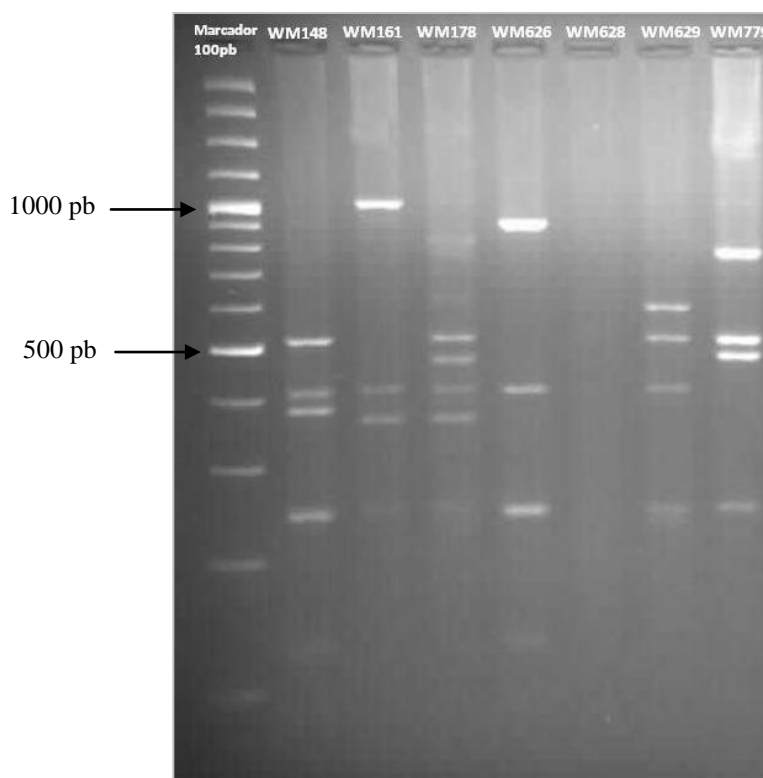


**Figura 15.** Imagem electroforética da reacção de amplificação obtida com *primers* específicos para o gene *PLB1* de *C. neoformans*.

#### 3.3.4 Polimorfismos de restrição do gene *PLB1* de *C. neoformans*

Após a confirmação da amplificação do gene *PLB1* por PCR, as amostras foram submetidas à acção enzimática da endonuclease de restrição *AvaI*, permitindo o corte do fragmento amplificado de modo a identificar os genótipos.

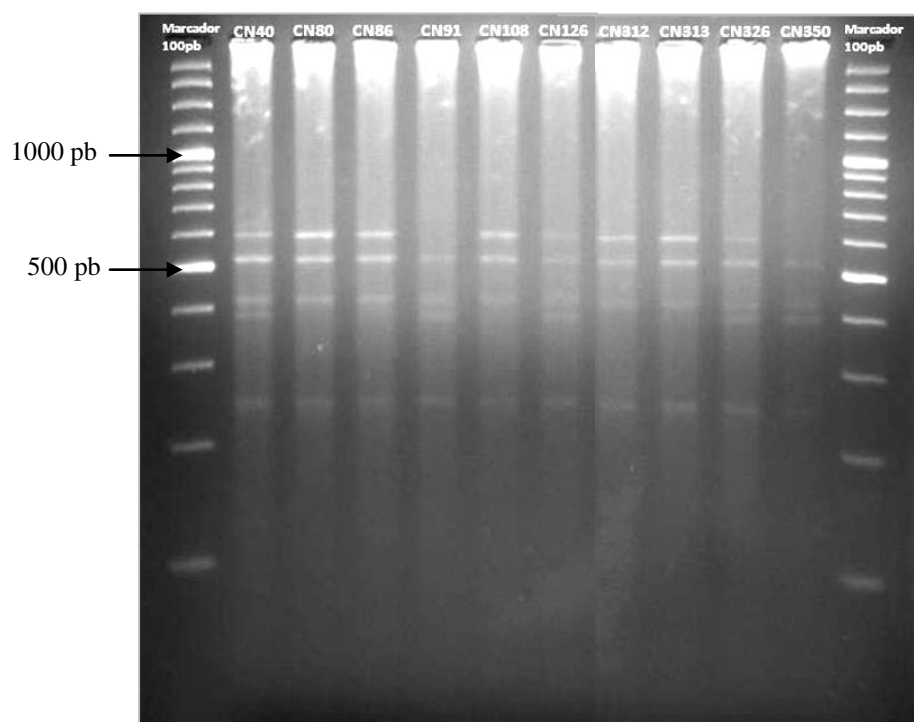
Antes de iniciar o estudo das amostras clínicas e ambientais, foi necessário definir os perfis de restrição dos oito tipos moleculares utilizando, para tal, as estirpes-padrão: VN I (WM148), VN II (WM 626), VN III (WM 628), VN IV (WM 629), VG I (WM 179), VG II (WM 178), VG III (WM 161) e VG IV (WM 779). Na Figura 16 são apresentados os resultados obtidos após restrição do gene *PLB1* das diferentes estirpes-padrão.



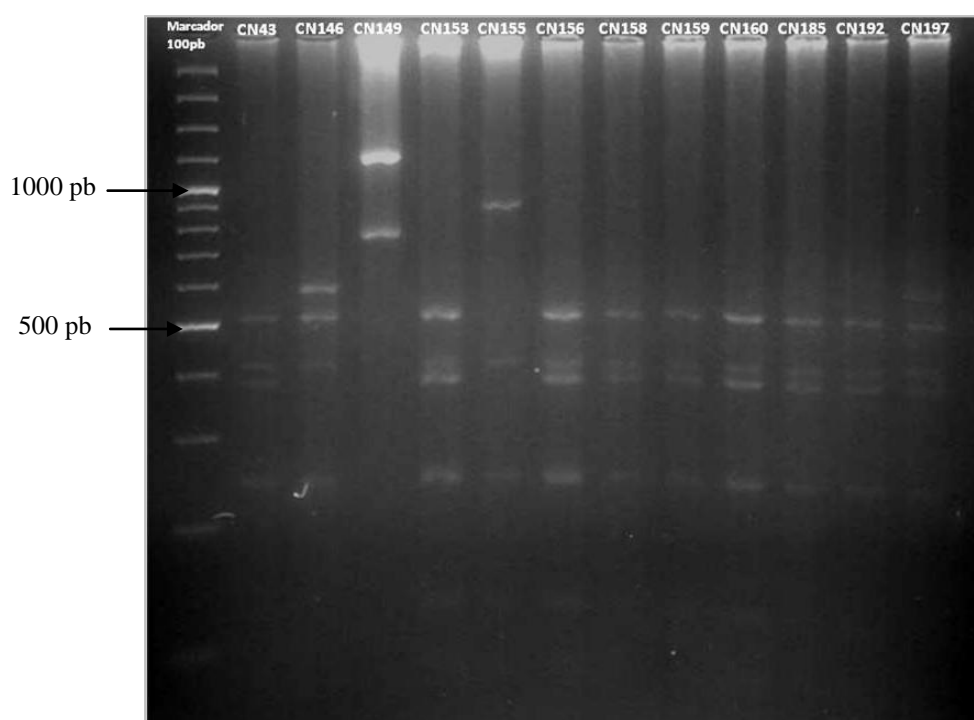
**Figura 16.** Perfis obtidos por electroforese com restrição com a enzima *AvaI* nas estirpes de referência descritas em Latouche *et al.* 2003.

Os tipos moleculares correspondentes a cada perfil foram comparados com os apresentados em Latouche *et al.* (2003). No entanto, no decorrer do trabalho ocorreram problemas com os isolados WM 179 e WM 628. No caso da primeira estirpe, após várias tentativas infrutíferas de amplificação do gene *PLB1*, verificou-se que a cultura se encontrava contaminada por *C. parapsilosis*, inviabilizando a sua utilização. Com o isolado WM 628, foi possível obter amplificação do gene, mas a banda gerada foi sempre demasiado ténue para ser possível visualizar um perfil electroforético após restrição.

Em seguida foram determinados os padrões electroforéticos por RFLP do gene *PLB1* dos 267 isolados clínicos e ambientais selecionados para este estudo. Estes foram depois visualmente comparados com os perfis das estirpes padrão, determinando-se assim seis dos oito tipos moleculares do complexo *C. neoformans/C. gattii* (Figuras 17 e 18).



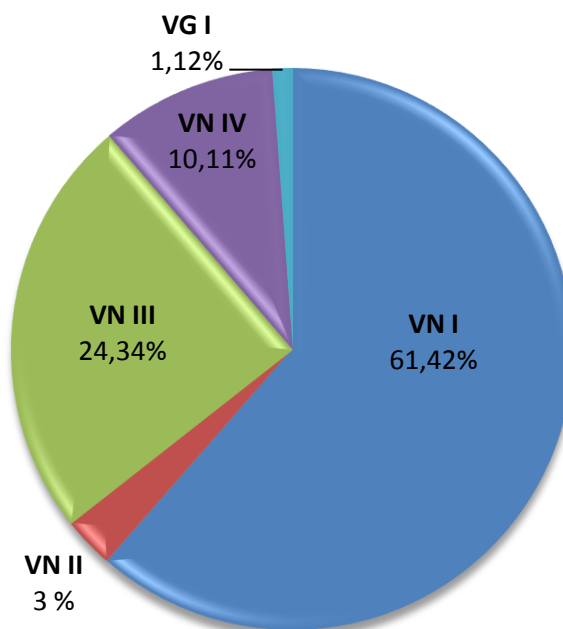
**Figura 17.** Perfis electroforéticos de alguns isolados da colecção estudada, obtidos após amplificação do gene *PLB1* seguida de restrição com a endonuclease *AvaI*. Estão representados os tipos moleculares VN III (CN 40, CN 126, CN 326), VN IV (CN 80, CN 86, CN 108, CN 312, CN 313) e VN I (CN 91, CN 350). O marcador de pesos moleculares de 100 pb também está representado.



**Figura 18.** Perfis electroforéticos de alguns isolados da colecção estudada, obtidos após amplificação do gene *PLB1* seguida de restrição com a endonuclease *AvaI*. Estão representados os tipos moleculares VN I (CN 43, CN 153, CN 156, CN 158, CN 159, CN 160, CN 185, CN 192), VN IV (CN 146), VG I (CN 149), VN II (CN 155) e VN III (CN 197). O marcador de pesos moleculares de 100 pb também está representado.

O tipo molecular VN I foi o mais prevalente entre todos os isolados estudados (61,42%), seguido do tipo VN III (24,34%) correspondente às estirpes híbridas. Os restantes genótipos de *C. neoformans* também foram identificados, apesar de em menor número (VN IV em 27, e VN II em oito). *C. gattii* foi identificado num número reduzido de isolados e somente foi detectado um dos quatro genótipos possíveis (VG I) em três isolados (Gráfico 1)

**Gráfico 1.** Prevalência dos tipos moleculares encontrados no total de 267 isolados analisados.



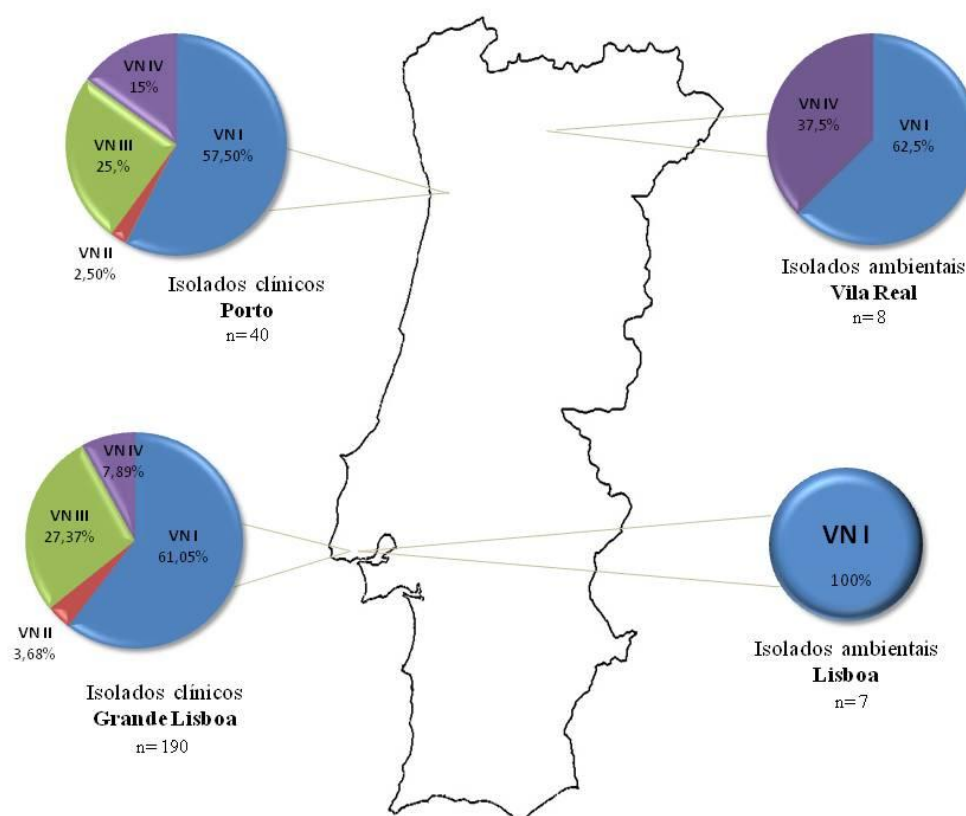
Entre os 15 isolados ambientais, 80% são do genótipo VN I, sendo que todos os isolados de Lisboa (sete) pertencem a este tipo molecular. Nos provenientes de Vila Real, o genótipo VN IV de *C. neoformans* foi identificado em três deles.

Relativamente aos isolados estrangeiros, foi encontrada uma grande diversidade de tipos moleculares, pertencentes às duas espécies do complexo *C. neoformans*. Os dois isolados provenientes da Guiné-Bissau têm tipos moleculares distintos, VN IV (CN 3) e VN I (CN 4), tal como os isolados cedidos pelo Instituto Pasteur de Paris, VN III (CN 79) e VN IV (CN 80). Já o único isolado proveniente de Angola (CN 27) mostrou o perfil electroforético VN I, tal como cinco dos nove isolados australianos. Entre estes, foram encontrados os outros dois genótipos de *C. neoformans*, VN III (CN 168) e VN IV (CN 175), e dois isolados de *C. gattii* do tipo molecular VG I (CN 150 e CN 177).

Na sua grande maioria, as estirpes de referência incluídas neste estudo são do tipo molecular VN I (75%), incluindo uma das duas estirpes originárias de matéria

vegetal (eucalipto) da Austrália, (CN 139). Já a outra estirpe desta proveniência (CN 149) foi identificada como *C. gattii*, com genótipo VG I. O tipo molecular VN III foi identificado no isolado CN 151 que, apesar de também ter origem vegetal, veio dos EUA.

Relativamente aos isolados provenientes de Portugal, foi possível observar que a ocorrência e distribuição dos genótipos encontrados entre as regiões da Grande Lisboa e Porto não apresentaram diferenças muito significativas (Figura 19).



**Figura 19.** Distribuição geográfica dos tipos moleculares obtidos pela análise de 245 isolados clínicos e ambientais portugueses por PCR-RFLP do gene *PLB1*.

Nas duas zonas, de onde os isolados são provenientes, o tipo VN I foi o mais frequente, seguido dos tipos VN III e VN IV. Um número reduzido de isolados possui genótipo VN II.

Relativamente aos isolados ambientais, os da região de Lisboa são todos do genótipo VN I, enquanto os da região de Vila Real apresentaram dois tipos moleculares (VN I e VN IV). Em nenhuma das zonas se encontraram isolados dos tipos moleculares VN II e VN III, bem como os tipos moleculares de *C. gattii*.

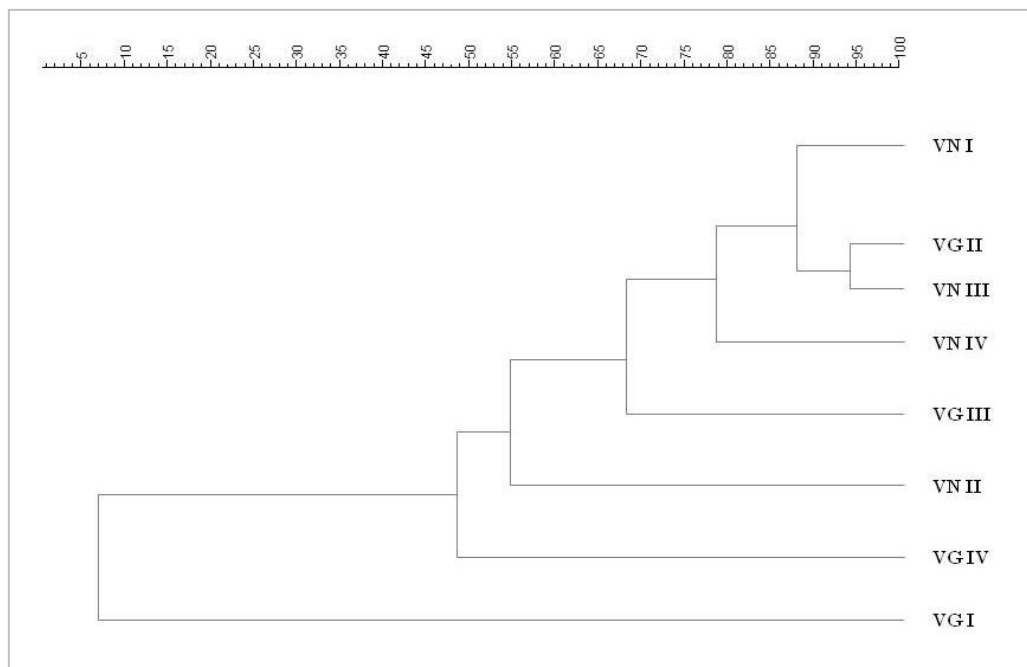
A partir de alguns doentes, foi possível obter mais do que um isolado de *C. neoformans* no decurso da infecção. Relativamente aos isolados obtidos a partir do mesmo paciente devido a recidiva ou a nova infecção, existem resultados interessantes a referir (Anexo II). Num total de 33 pacientes, em 23 foram sendo isoladas estirpes de *C. neoformans* do mesmo genótipo ao longo da infecção. Contudo, nos restantes 10 doentes, foram identificados genótipos diferentes. Em dois desses pacientes, os isolados foram provenientes de amostras biológicas diferentes recebidas na mesma altura no laboratório, para diagnóstico (LCR e sangue). Nos outros oito, estes foram isolados a partir do mesmo tipo de amostra biológica ou de amostras diferentes provenientes do mesmo paciente, mas em diferentes alturas da infecção. Em sete destes casos, os genótipos variaram entre os tipos moleculares VN I e VN III e, em dois casos, entre VN III e VN IV. Adicionalmente, com um dos doentes (#12), foram identificados isolados de três genótipos (VN I, VN III e VN IV) obtidos sequencialmente ao longo da infecção criptocócica.

### 3.3.5 Análise comparativa

As imagens dos perfis de 273 isolados, exceptuando WM 179 e WM 626, foram inseridas na base de dados do programa GelCompar II<sup>®</sup>. O dendrograma resultante da análise dos perfis de todos os isolados está representado na Figura 22, Anexo IV.

Na Figura 20 está representado um dendrograma esquemático sobre os *clusters* criados correspondentes aos tipos moleculares encontrados. É possível observar que o genótipo VG I é o mais afastado filogeneticamente dos outros, seguido de VG IV. Porém, é interessante verificar que os restantes tipos moleculares de *C. gattii* não se encontram em *clusters* próximos dos referidos anteriormente, mas sim entre os isolados de *C. neoformans*. O genótipo VG II encontra-se no mesmo *cluster* que VN I e VG III, mostrando similaridade com o *cluster* que inclui os genótipos agora referenciados, bem

como as estirpes híbridas de *C. neoformans* (VN III) e *C. neoformans* var. *neoformans* (VN IV).



**Figura 20.** Dendrograma geral obtido através do programa GelCompar II® (Applied Maths, Bélgica).

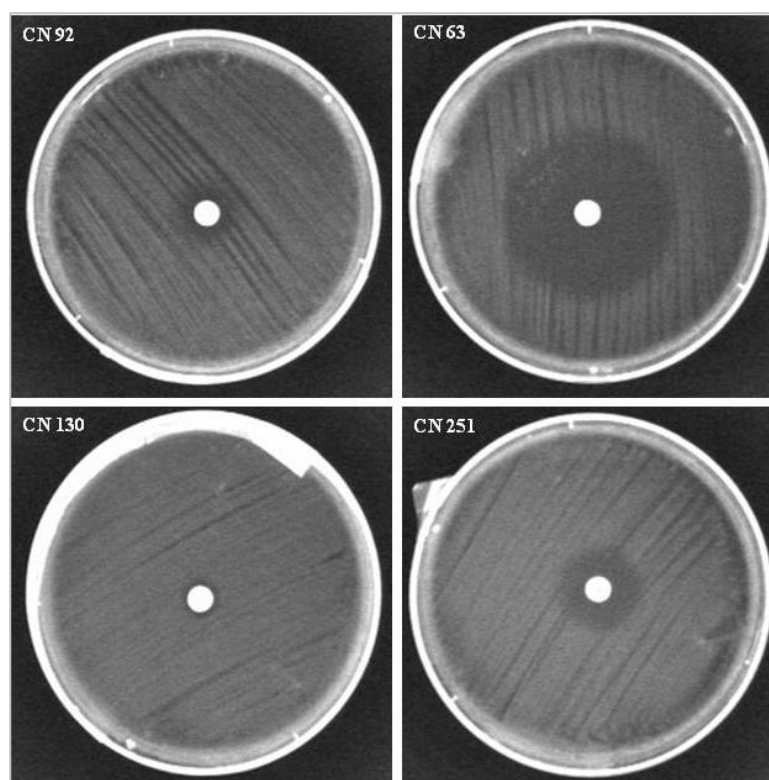
Fazendo uma análise mais aprofundada da organização dos isolados no dendrograma, verifica-se que um isolado ficou colocado num *cluster* que não corresponde ao seu tipo molecular. É o caso do isolado CN 283 (VN I), que se encontra relacionado com o tipo molecular VN III.

Não se observaram mais incongruências relativamente a estas estirpes de referência. As estirpes de referência WM 161 e WM 779 correspondentes aos genótipos VG III e VG IV, respectivamente, ficaram isoladas, pois não foram identificados estes genótipos nos isolados clínicos e ambientais estudados. Pelo contrário, dos genótipos VG I e VN II não foi possível dispor dos perfis moleculares das respectivas estirpes de referência (WM 179, WM 626, respectivamente) pelas razões anteriormente descritas. O único *cluster* no qual se verificou concordância na totalidade dos isolados foi o que agrupou os isolados de genótipo VN IV.



### 3.4. Estudo da sensibilidade aos antifúngicos, pelo método de Kirby-Bauer

Foram realizados testes de susceptibilidade ao fluconazol e voriconazol em 98 isolados clínicos e ambientais. Através do *software* de leitura BIOMIC Expert-System<sup>®</sup> determinou-se do diâmetro do halo, a respectiva CMI e o grau de susceptibilidade antifúngica: resistente, susceptível dependendo da dose e susceptível. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 21 e Anexo V.



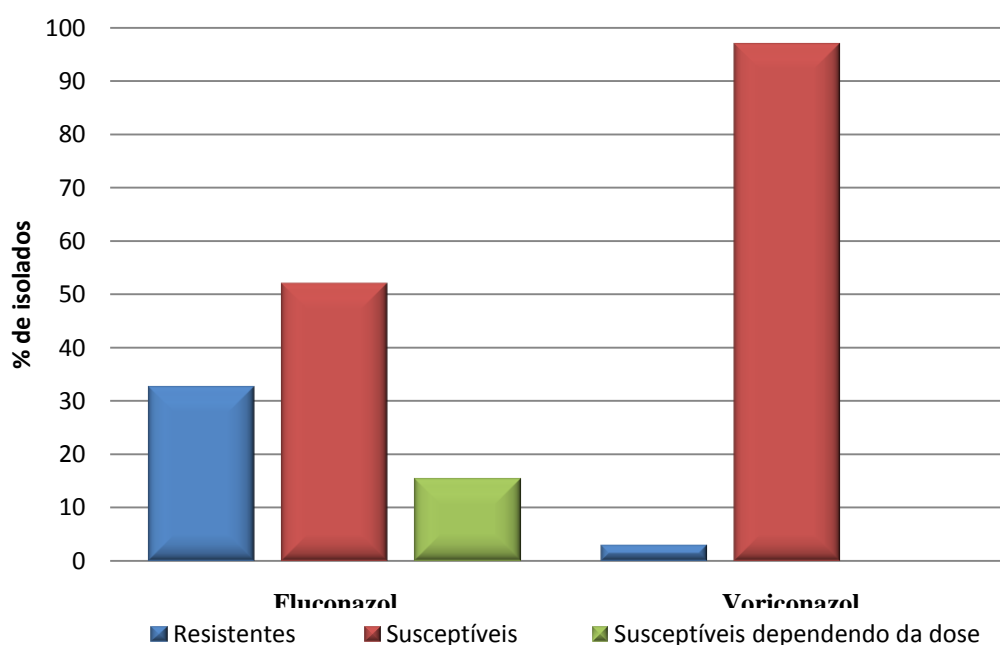
**Figura 21.** Fotografias dos halos de inibição aos antifúngicos fluconazol e voriconazol. As imagens foram obtidas através do *software* BIOMIC Expert-System<sup>®</sup> (Giles Scientific Inc., EUA). Relativamente ao fluconazol, CN 92 foi classificado como resistente, CN 63 como susceptível e CN 251 como susceptível dependendo da dose. CN 130 demonstrou ser resistente ao voriconazol.

A grande maioria dos isolados estudados mostraram serem susceptíveis aos dois antifúngicos estudados, porém o número de isolados resistentes foi bastante significativo (Gráfico 2).

Relativamente ao fluconazol, mais de metade dos isolados (52 %) mostrou ser susceptível, 15 (15,3 %) isolados mostraram ser susceptíveis dependendo da dose e 32 (32,7%) resistentes.

Contrariamente, poucas estirpes mostraram ser resistentes ao voriconazol (n=3). Na realidade, 96,9% dos isolados estudados revelaram susceptibilidade a este antifúngico.

**Gráfico 2.** Percentagem de isolados resistentes, susceptíveis e susceptíveis dependendo da dose aos dois antifúngicos estudados, fluconazol e voriconazol, pelo método de Kirby-Bauer.



A grande maioria dos isolados estudados (n=66) é originária da região da Grande Lisboa. Foram estudados somente seis isolados da região do Porto, os quais se mostraram susceptíveis aos dois antifúngicos, excepto o isolado (CN 87) que se revelou susceptível dependendo da dose ao fluconazol. Cerca de 44% dos isolados de Lisboa é resistente ao fluconazol enquanto apenas dois isolados (CN 72 e CN 130) são resistentes ao voriconazol. Com base nos resultados obtidos, foi possível verificar que os isolados da região da Grande Lisboa tiveram CMIs que variaram entre  $< 0,25$  e  $> 165$   $\mu\text{g/ml}$  para o fluconazol e entre  $< 0,01$  e  $> 6,1$   $\mu\text{g/ml}$  para o voriconazol (Tabela 9). Os isolados do

Porto apresentaram CMI's entre 5 e 47 µg/ml para o fluconazol e 0,02 e 0,18 µg/ml para o voriconazol.

Relativamente aos isolados ambientais, foram testados os antifúngicos em seis deles. Dos cinco isolados de Lisboa testados, todos se apresentaram susceptíveis a ambos os fármacos. O único isolado proveniente de Vila Real mostrou ser susceptível ao voriconazol e resistente ao fluconazol, apresentando uma CMI consideravelmente superior (Tabela 11).

**Tabela 11.** Resultados obtidos com o teste de sensibilidade ao fluconazol e voriconazol dos isolados clínicos e ambientais de origem Portuguesa, realizado pelo método de Kirby-Bauer.

	Isolados Clínicos					
	Fluconazol			Voriconazol		
	S	SDD	R	S	SDD	R
<b>Grande Lisboa</b> (n=66)	29 (44%)	13 (20%)	24 (36%)	64 (97%)	0	2 (3%)
<b>Porto</b> (n=6)	5 (83%)	1 (17%)	0	6 (100%)	0	0

	Isolados Ambientais					
	Fluconazol			Voriconazol		
	S	SDD	R	S	SDD	R
<b>Lisboa</b> (n=5)	5 (100%)	0	0	5 (100%)	0	0
<b>Vila Real</b> (n=1)	0	0	1 (100%)	1 (100%)	0	0

As CMI's dos isolados da região de Lisboa variaram entre 0,68 e 17 µg/ml para o fluconazol e entre 0,04 e 0,51 µg/ml para o voriconazol, enquanto que as dos isolados do Porto variaram entre 11 e > 165 µg/ml para o fluconazol e < 0,01 e 0,15 µg/ml para o voriconazol.

Os isolados clínicos provenientes de países estrangeiros mostraram uma grande heterogeneidade de resultados aos testes de susceptibilidade aos antifúngicos. Enquanto

os dois isolados da Guiné-Bissau foram resistentes a ambos os fármacos antifúngicos, os isolados franceses mostram uma grande diversidade de susceptibilidade entre eles. A estirpe CN 79 apresentou uma CMI considerada susceptível dependendo da dose ao fluconazol mas é susceptível ao voriconazol, enquanto CN 80 se mostrou resistente a ambos os antifúngicos.

Dos seis isolados ambientais australianos estudados, cinco foram susceptíveis ao fluconazol e todos ao voriconazol. O isolado CN 171 teve valor de CMI muito elevado ao fluconazol ( $> 165 \mu\text{g/ml}$ ), sendo por isso, considerado resistente.

Foi igualmente testada a sensibilidade aos antifúngicos de algumas estirpes de referência e todas as testadas mostraram ser susceptíveis ao voriconazol. Os isolados da colecção PYCC mostraram ser susceptíveis ao fluconazol excepto CN 151 (PYCC 5028) que exibiu resistência. Os isolados da colecção WM foram todos resistentes a este fármaco, excepto a WM 161, que revelou ser susceptível.

### 3.5 Análise estatística

Os resultados da análise estatística dos tipos moleculares e dos respectivos testes de susceptibilidade são apresentados na tabela 24, Anexo VI.

Na Tabela 12 está apresentada a estatística descritiva de todos os parâmetros analisados. No total, foram analisados os dados de susceptibilidade de 93 isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* a dois antifúngicos. Não foram incluídas as estirpes de referência “WM” na medida em que não foi possível obter os resultados da susceptibilidade representativos de todos os tipos moleculares identificados neste trabalho. Verificou-se que os padrões de CMI, mínima e máxima, relativas ao fluconazol (0,25 e 165 µg/ml) e voriconazol (0,01 e 6,10 µg/ml) são bastante diferentes. Na base de dados do programa informático SPSS®, os tipos moleculares foram identificados de um a seis, correspondendo aos tipos moleculares identificados neste trabalho, de VN I a VG II.

**Tabela 12.** CMIs obtidas nos testes de susceptibilidade *in vitro*, aos antifúngicos fluconazol e voriconazol (parâmetros obtidos pelo *software* SPSS® (IBM, EUA))

Antifúngico	Dimensão da amostra	CMI média (µg/ml)	CMI mínima (µg/ml)	CMI máxima (µg/ml)
<b>Fluconazol</b>	93	59,16	0,25	165
<b>Voriconazol</b>	93	0,25	0,01	6,10

As correlações entre o tipo molecular de *C. gattii* identificado (VG I) e os restantes tipos moleculares não foram realizadas visto a amostra ser muito reduzida.

Relativamente à correlação entre VN I e VN II, é possível verificar uma diferença significativa entre as CMIs para voriconazol nos dois tipos moleculares ( $p=0,047$ ), sendo VN I menos susceptível a este antifúngico (31,11 µg/ml) do que VN II (17,79 µg/ml). O mesmo não se pode verificar relativamente aos testes com fluconazol, pois o valor- $p$  foi bastante superior ao padrão ( $p=0,3$ ).

As mesmas conclusões relativamente ao voriconazol podem ser estendidas às restantes correlações, com excepção para as correlações entre VN I-VN IV e VN III-VN IV. Todas mostraram valor- $p$  inferior a 0,05. VN III é estatisticamente mais resistente

ao voriconazol (45,98 µg/ml) do que VN I (33,13 µg/ml), bem como VN II (17,61 µg/ml e 6,79 µg/ml, respectivamente). VN IV é menos susceptível (12,05 µg/ml) do que VN II (5,50 µg/ml). Quanto ao fluconazol, nenhuma correlação mostrou diferenças estatisticamente significantes entre as CMI's de cada um dos dois tipos moleculares estudados.

## **4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

---

#### 4.1 Estirpes estudadas

Apesar deste estudo não incluir o total de 337 isolados da colecção de *C. neoformans*, os 308 isolados aqui analisados são uma parte bastante significativa da mesma. Grande parte destes isolados, são provenientes de amostras biológicas de pacientes internados em diversas unidades hospitalares do país, principalmente da região da grande Lisboa (213 isolados), e do maior hospital da cidade, o HSM (132 isolados). Seguiu-se o HEM (49 isolados), que pela proximidade geográfica do Laboratório, envia amostras biológicas para diagnóstico laboratorial da criptococose. Os restantes isolados foram obtidos no âmbito de colaborações pontuais, tal como os isolados do norte do país, na sua grande maioria da cidade do Porto. De uma forma global, foi possível verificar que muitas outras regiões de Portugal não estavam representadas, dando assim relevo à importância de estabelecer mais colaborações com as unidades hospitalares desses locais, a fim de enriquecer a colecção existente. Isto possibilitaria uma grande quantidade e qualidade de dados para futuros trabalhos em epidemiologia da criptococose em Portugal. É possível que alguns destes isolados pertençam a pacientes que residam ou que tenham adquirido a infecção noutra local, mas tenham sido internados em unidades hospitalares com mais recurso a diagnóstico. Na verdade, como tem sido referido ao longo do trabalho, há muitas faltas de informação clínica sobre os doentes a partir dos quais foram isoladas as estirpes. Visto grande parte das leveduras já terem sido isoladas há muitos anos, é possível que determinadas informações, como área de residência, factores de risco, patologias subjacentes, terapêutica, entre outros, já não se encontrem disponíveis para consulta. Por essa razão, é necessário alertar os clínicos para a importância do registo de certos dados que poderão ser cruciais para o entendimento de como foi adquirida a infecção, bem como a ocorrência e epidemiologia da criptococose nas diferentes zonas do nosso país.

A amostra clínica a partir da qual foi isolado maior número de estirpes de *C. neoformans* foi o LCR, o que reflete o elevado tropismo desta levedura para o SNC (Lin & Heitman 2006; Li & Mody 2010). Isolamentos a partir de sangue também foram frequentes, o que está relacionado com a disseminação do agente no início da infecção (Lin & Heitman 2006). Apesar do aparelho respiratório, mais concretamente os



pulmões, serem o primeiro local a ser colonizado após a inalação do agente (Li & Mody 2010), apenas foi isolado *C. neoformans* a partir de quatro produtos de origem pulmonar (LBA e biópsia pulmonar). Li e Mody (2010) também referem que o isolamento de *C. neoformans* a partir de biópsias cutâneas é raro, indiciando a ampla disseminação da criptococose. Entre as estirpes estudadas, três casos foram provenientes de biópsias cutâneas.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram-se consistentes com outros estudos realizados anteriormente. Verificou-se uma maior prevalência de infecções em pacientes do sexo masculino (aproximadamente 85%), o que é congruente com os estudos de Dromer *et al.* (1993), Sorvillo *et al.* (1997), Hajjeh *et al.* (1999), Tintelnot *et al.* (2001), Viviani *et al.* (2006) e Li & Mody (2010). Estes estudos observaram uma incidência mais elevada da infecção por espécies do complexo *C. neoformans* nos homens do que nas mulheres. Os últimos autores chegam a considerar o sexo dos pacientes um importante factor de susceptibilidade à infecção. Estes também afirmaram que existem diferenças na distribuição da infecção entre as espécies do complexo, relatando uma maior uniformidade com *C. neoformans* (1,3:1 entre homens e mulheres) do que com *C. gattii*, onde a proporção de infecção no sexo masculino é consideravelmente maior (3,3:1). Todavia, no presente trabalho, não foi possível observar esta prevalência, visto que os seis isolados de *C. gattii* identificados são, na totalidade, originários de fontes ambientais. A diferença de incidência desta doença entre os dois sexos talvez possa ser explicada por uma maior exposição dos homens a fontes ambientais contaminadas e transmissoras de propágulos fúngicos, através da actividade laboral. Outra razão pode estar ligada ao facto desta infecção estar fortemente associada à infecção pelo VIH e a maioria destes doentes serem homens, embora não haja estudos anteriores neste sentido.

Na literatura, é referido não existir uma correlação muito directa entre a idade dos pacientes e a infecção (Sorvillo *et al.* 1997), apesar de em diversos estudos, o intervalo de idades dos doentes estar compreendido entre 22 e 44 anos (Sorvillo *et al.* 1997; Hajjeh *et al.* 1999), o que está de acordo com o que foi observado neste trabalho, em que a média de idades é de 37 anos. Sorvillo e seus colaboradores (1997) observaram uma tendência significativa para a diminuição do número de casos de criptococose com o aumento da idade. Os autores sugerem que isso pode estar relacionado com uma menor exposição às fontes ambientais. Apesar disso, neste

trabalho foram estudados isolados de pacientes com uma grande amplitude de idades, alguns deles já de uma idade bastante avançada, como por exemplo, CN 15, CN 101, CN 314, CN 322 e CN 324. O primeiro isolado pertence a um paciente de 85 anos internado no IPO, colocando-se a hipótese de, a par desta infecção, estar a realizar tratamentos oncológicos. Mesmo não tendo dados acerca do seu estado imunológico, a criptococose já foi anteriormente identificada em pacientes com cancro (Kontoyiannis *et al.* 2001). Estes autores referem que a criptococose poderá não estar apenas associada à infecção por VIH ou outros factores de risco, estando o seu diagnóstico dependente da suspeita do clínico, visto as demonstrações clínicas serem por vezes mimetizadas por outras patologias. As outras quatro estirpes também foram isoladas de pacientes com idade superior a 70 anos, sobre os quais também não se possui informação sobre factores de risco. Poderia ter-se dado o facto de estes pacientes serem VIH-positivos e/ou terem estado expostos a fontes ambientais muito antes da doença se ter manifestado clinicamente. Diversos estudos sugerem que o microrganismo pode ter sido adquirido muito tempo antes do desenvolvimento da infecção, como no caso de um paciente africano a viver em França, em relação ao qual se pensa ter mantido dormente uma infecção criptococócica durante 13 anos (Garcia-Hermoso *et al.* 1999). Dromer e colaboradores (1992) mostraram que *C. neoformans* pode sobreviver no hospedeiro (muito provavelmente nos macrófagos alveolares) sem causar doença, e que apenas se multiplica, dissemina e causa doença quando os factores biológicos e ambientais forem favoráveis, o que pode vir a ocorrer apenas ao fim de meses ou até anos (Dromer *et al.* 1992; Garcia-Hermoso *et al.* 1999). Este poderá ter sido o caso de alguns isolados estudados neste trabalho, embora não seja possível confirmá-lo. É realmente importante a realização de relatórios detalhados assim que a doença é diagnosticada, os quais devem incluir informações de viagens e patologias no momento e anteriores (Garcia-Hermoso *et al.* 1999). Esta informação, associada à análise genotípica das estirpes provenientes de diversas regiões geográficas, será extremamente relevante para a detecção de estirpes emergentes em regiões não-endémicas e um passo importante para a vigilância epidemiológica da criptococose (Hagen *et al.* 2010a).

Da informação que nos foi disponibilizada, confirmou-se que 12 isolados clínicos pertencem a pacientes VIH positivos, sendo que um deles também possuía outro factor de depressão imunológica, uma infecção por *M. tuberculosis* (CN 26).

Todavia, não foi possível confirmar se o paciente fora co-infectado pelos dois microrganismos, o que não seria de todo impossível já que têm sido reportados casos semelhantes (Manfredi & Calza 2008; Desnos-Ollivier *et al.* 2010; Van Tongeren *et al.* 2011). Apesar de raros, tem sido referida a co-infecção em indivíduos VIH-positivos e em aparentemente saudáveis. Van Tongeren e colaboradores (2011) afirmam no seu trabalho, que *M. tuberculosis* e *C. neoformans* têm efeitos imuno-modeladores no hospedeiro, devendo os clínicos estar devidamente alertados para a possibilidade de infecções mistas. Apesar de não se saber se CN 26 foi um caso semelhante, pode colocar-se a hipótese de ser um caso de co-infecção, visto o paciente em causa sofrer de uma desregulação do sistema imunitário, alterando assim as suas defesas. Neste caso, foi identificado *C. neoformans* var. *grubii*, embora já tenha sido reportado um caso semelhante causado por *C. gattii* (Van Tongeren *et al.* 2011).

Relativamente às estirpes estudadas neste trabalho, cinco foram isoladas de pacientes VIH-negativos, apesar de três doentes possuírem outros factores de imunossupressão, como por exemplo, associado ao transplante de órgãos (Husain *et al.* 2001, Singh *et al.* 2008). O isolado CN 187 foi proveniente de uma paciente transplantada renal sem aparente alteração imunológica. Teria sido interessante saber se a paciente já se encontrava infectada por *C. neoformans* e, se neste caso, a infecção se encontrava dormente, ou se esteve relacionada com uma intervenção cirúrgica à qual foi submetida. Estas hipóteses são suportadas por Singh e os seus colegas (2008), que afirmam no seu estudo que a maioria dos pacientes que desenvolveram a doença, exibiam serologia positiva para *C. neoformans* antes do transplante. Em alguns casos, as manifestações clínicas da infecção surgiram muito depois da intervenção, sugerindo que um número significativo de casos de criptococose associados a transplantes, resulta de reactivação da infecção. Por outro lado, também se pode ter tratado de uma infecção primária que ocorreu após o transplante, sendo raros os casos relatados de transmissão através do órgão transplantado (Singh *et al.* 2008). As infecções primárias podem ocorrer devido ao decréscimo na imunidade dos indivíduos transplantados associado a um contacto com o microrganismo, quer no ambiente hospitalar, quer no exterior. A mesma hipótese pode ser aplicada ao paciente que sofria de leucemia linfática crónica (CN 237). Esta, sendo uma doença que diminui a imunidade incapacita o sistema imunitário de se defender agentes patogénicos que o possam infectar. Por último, a

diabetes tem sido referida como outro factor de risco para infecção por *C. neoformans*, como foi observado no caso de onde foram isolados CN 87 e CN 88. Este paciente sofria de diabetes que, segundo Hajjeh *et al.* (1999), é um factor que aumenta em quase em quatro vezes a possibilidade do desenvolvimento da doença, relativamente à população em geral. Em conclusão, é de facto importante a análise dos factores de risco e do estado imunológico dos pacientes para compreender como a infecção foi adquirida, a fim de estabelecer o tratamento mais adequado.

Sabe-se ainda que dois pacientes a partir dos quais foram isolados duas estirpes de *C. neoformans* eram aparentemente saudáveis, não tendo sido registado qualquer factor de imunossupressão. Apesar de não ser exclusiva, tem sido relatada frequentemente a infecção por *C. gattii* em doentes imunocompetentes (Lui *et al.* 2006). Contudo, nos isolados CN 87 e CN 88, o agente patogénico isolado foi *C. neoformans*, o que é menos comum.

Relativamente aos isolados ambientais, os factos são semelhantes aos descritos anteriormente com os clínicos. Foram isolados a partir de fontes ambientais de apenas duas regiões de Portugal, num intervalo de 10 anos: Lisboa, onde talvez exista forte relação com o elevado número de estirpes clínicas isoladas, e Vila Real, onde se verificou haver locais com matéria vegetal colonizada por *C. neoformans*. Porém, para um estudo de vigilância da transmissão da criptococose mais rigoroso, seria necessário recolher um maior número de isolados ambientais, de diversos tipos de amostra, nas regiões em que a doença tem sido relatada. Todavia, este plano requer meios humanos e materiais especializados que poderão não estar acessíveis facilmente para a realização deste trabalho de vigilância em contínuo.

Neste trabalho, também foram incluídos isolados clínicos e ambientais de outras regiões do globo. Como estes fazem parte de casos pontuais e de um número muito reduzido de isolados, não será possível inferir sobre a epidemiologia desta infecção sem saber qual a situação real dos países dos quais são provenientes. Porém, estes poderão permitir uma comparação com trabalhos já publicados nesses países.

As estirpes de referência foram provenientes de uma grande variedade de fontes e permitiram a genotipagem de isolados portugueses de *C. neoformans*, servindo de padrão.

## 4.2 Identificação dos isolados por métodos convencionais

### 4.2.1 Exame directo

Uma das características distintivas na morfologia microscópica das espécies do complexo *C. neoformans* é a presença de cápsula mucopolissacarídea, mais ou menos espessa, quando observada em preparação com tinta-da-China (Ellis *et al.* 2007). No único exame directo observado durante o decorrer do trabalho, a cápsula não se mostrou bem evidenciada como seria suposto. Isto pode ter a ver com o facto do sistema imunitário do doente não ser suficientemente agressivo, para que as leveduras tenham necessidade de produzir cápsula, ou com o facto de o doente estar sob terapêutica profilática antifúngica durante um período de tempo prolongado antes da colheita da amostra biológica.

Por outro lado, os aglomerados de tinta-da-China visíveis na preparação devem-se geralmente às características bioquímicas do LCR do paciente, dificultando a observação dessas preparações. Esta ideia é suportada pelas imagens de exames directos realizados com outras amostras clínicas (Figura 9) aquando da sua chegada ao laboratório, nas quais a cápsula polissacarídea se apresentava bem evidenciada.

### 4.2.2 Cultura

Algumas hipóteses podem ser colocadas para explicar porque quatro dos isolados mantidos congelados, não cresceram em meio de cultura. Os isolados são mantidos em criotubos em meio de Sabouraud com 50% de glicerol a, aproximadamente, -80 °C. No momento em que o inóculo foi feito, este pode ter sido insuficiente, e não tivesse sido colocado número suficiente de unidades formadoras de colónias para mais tarde recuperar a estirpe em cultura. Se o meio de cultura dos tubos tivesse uma menor percentagem de glicerol, poderia levar ao rebentamento das células, e consequente morte celular, mas nesse caso, teriam morrido mais isolados porque o meio de cultura foi o mesmo.

Outra hipótese está relacionada com as diferenças de temperatura a que os inóculos estiveram submetidos quando se realizou a cultura. No momento em que se

pretendia inocular os isolados em meio de cultura sólido, foi necessário retirar as caixas da arca frigorífica de -80 °C, a qual se encontra numa sala devidamente climatizada e afastada dos laboratórios, e transferi-las para uma arca -20° C, existente no laboratório. Apesar de este procedimento se fazer no menor espaço de tempo possível e momentos antes de se fazer a cultura, é possível que a diferença de temperatura tenha danificado as células impossibilitando o seu crescimento.

Os isolados dos quais se conseguiram obter cultura, assemelham-se macroscópica e microscopicamente à descrição feita por Ellis e os seus colaboradores (2007). *C. neoformans* e *C. gattii* possuem colónias mucóides de cor creme que, quando observadas ao microscópio óptico, apresentam células de forma globosa ou ovóide. A morfologia e as dimensões das células são muito semelhantes entre as duas espécies, sendo morfologicamente indistinguíveis (Ellis *et al.* 2007). Com base nesta descrição, é possível concluir que o que foi observado macroscópica e microscopicamente neste trabalho foram colónias típicas de *C. neoformans* e *C. gattii*, que posteriormente foram identificadas a nível molecular.

Apesar do crescimento em cultura em meio sólido ser um processo moroso até à maturação da colónia para que se possa identificar a espécie, o que por vezes necessitou de um mês, este ainda é considerado o método-padrão para o diagnóstico laboratorial da criptococose (Saha *et al.* 2008).

#### 4.2.3 Pesquisa de antígeno de *C. neoformans*

A pesquisa de antígeno de *C. neoformans* nas amostras biológicas tem sido fundamental no diagnóstico da criptococose (Enoch *et al.* 2006), devendo ser sempre complementada com exame directo com tinta-da-China e com cultura para a identificação da espécie (Osuna *et al.* 2008). Mitchell e Perfect (1995) afirmam que o diagnóstico por antígeno apresenta maior sensibilidade (95%) do que a cultura (75%) e exame directo (50%), dados estes corroborados por Osuna e os seus colegas (2008). Contudo, os clínicos devem ser alertados sobre a possibilidade de falsos-positivos e falsos-negativos (Li & Mody 2010). Foram estudadas, por Eng e Person (1981), modificações no método inicial de aglutinação sem pôr em causa a sensibilidade do teste. Os resultados falsos positivos podem ser causados pelo factor reumatoide, que

está relacionado com anticorpos que actuam contra proteínas do hospedeiro (Mitchell & Perfect 1995), o que pode significar que o indivíduo já não tem infecção. Já os falsos-negativos podem ser causados por baixos níveis de antígeno, por se estar perante uma estirpe acapsulada ou com uma cápsula muito reduzida, pela presença de complexos imunes ou pelo elevado título de antígeno (efeito prozona). Estes dois últimos factores podem ser eliminados diluindo a amostra ou tratando-a com pronase antes de realizar o teste, respectivamente. Esta proteinase também ajuda a diminuir a incidência de falsos-positivos (Mitchell & Perfect 1995). Estes procedimentos foram realizados em todas as amostras estudadas, assim que chegavam ao laboratório.

Relativamente ao teste realizado no decurso do trabalho, verificou-se que o título foi positivo na diluição de 1:2. Visto este teste apenas ser realizável em produtos como LCR, sangue e urina, não foi possível determinar o antígeno capsular em muitos dos produtos a partir dos quais foram isoladas as leveduras estudadas. Nas amostras clínicas em que foi determinado o título de antígeno, verificou-se um intervalo de titulações entre 1:2 e 1:64000. Em oito casos não se verificou aglutinação, tendo o resultado sido considerado negativo. Estes casos podem corresponder a falsos-negativos, pois está relatado que há cerca de 5% de falhas na sensibilidade do teste de aglutinação, enquanto os restantes testes complementares de diagnóstico (exame directo e cultura) são positivos. Singh e os seus colegas (2008) referem que a titulação de antígeno deve manter-se estável ou idealmente decrescente ao longo do tratamento da infecção. Na maioria dos pacientes monitorizados verifica-se esse decréscimo, apesar de, em 13 dos 33 pacientes dos quais foram isolados mais de um isolado clínico, ter havido um aumento da titulação em algum ponto da infecção. Estes dados são explicados por Mitchell & Perfect (1995), que afirmam que a titulação do antígeno é insuficiente para o diagnóstico de uma recidiva e início de um novo tratamento. Os persistentes aumentos dos níveis de titulação no LCR podem reflectir um bloqueio na eliminação do antígeno, ou uma contínua produção de elevados níveis de antígeno no SNC.

Em conclusão, a pesquisa de antígeno de *C. neoformans* continua a ser um processo complementar ao diagnóstico clínico da criptococose. Apesar de possuir certas limitações relativamente a falsos resultados, possui uma elevada sensibilidade e permite obter resultados rápidos (Saha *et al.* 2008).

#### 4.2.4 Identificação bioquímica

A identificação bioquímica através do sistema API ID 32C<sup>®</sup> tem-se mostrado eficaz na identificação de leveduras isoladas em laboratórios clínicos (Ramani *et al.* 1998). Como foi referido anteriormente, os isolados provenientes do HSM e do IPO foram identificados nos laboratórios de microbiologia das respectivas unidades hospitalares utilizando o sistema automatizado MicroScan Walkaway<sup>®</sup>. Nos laboratórios clínicos dos hospitais, e devido à urgência de emitir resultados para instituir mais rapidamente a terapêutica, os sistemas automatizados de identificação, como o anteriormente referido ou o VITEK<sup>®</sup> (Biomérieux, França), têm substituído os métodos convencionais, incluindo o API ID 32C<sup>®</sup>. O princípio básico é o mesmo, mas é possível obter resultados em menor tempo, aproximadamente 4 horas, em vez de 48 horas (St.-Germain & Beauchesne 1991). Durante o trabalho, a identificação bioquímica teve que ser confirmada em alguns isolados. Com excepção de um isolado, todos os outros na verdade não eram de *C. neoformans*. A suspeita surgiu depois de sucessivas tentativas de amplificação do gene *PLB1* sem sucesso, associada à consistência não característica das colónias, para que fossem *C. neoformans*, devido à cor branca e textura granulosa. Após identificação dessas culturas por API ID 32C<sup>®</sup>, concluiu-se que tinha havido contaminação das culturas congeladas, e não um erro de identificação, visto os isolados originais já terem sido estudados em trabalhos anteriores. Diversos estudos têm referido que o sistema API ID 32C<sup>®</sup> tem sensibilidade até 98% na identificação das leveduras de importância clínica (Ramani *et al.* 1998; Pincus *et al.* 2007; Szabó *et al.* 2008). Estas situações realçam a importância do cuidado que se deve ter no manuseamento das culturas dos isolados, especialmente quando se trata de uma colecção de grandes dimensões, a partir da qual se realizam diversas investigações. Por segurança, é igualmente necessário fazer mais do que uma cópia dos mesmos isolados, guardadas em diferentes locais, para recuperação das estirpes em caso de contaminações. Este caso aplicar-se-ia à colecção estudada mas, por falta de tempo no trabalho prático, não foi possível recuperar as estirpes a partir de cópias depositadas noutras instituições.



### 4.3 Genotipagem de isolados de *C. neoformans* por RFLP do gene *PLB1*

#### 4.3.1 Extracção do DNA genómico e análise da sua qualidade

Como já foi referido, cerca de metade dos isolados de onde foi extraído o DNA não foi sujeita a um processo de purificação, visto o protocolo utilizado no laboratório durante trabalhos anteriores não o referir (Meyer *et al.* 2003). Apesar de este método se ter mostrado relativamente eficaz, apresentou a desvantagem do DNA não se encontrar dentro dos limites ideais de pureza, após leitura no *Nanodrop*<sup>®</sup> (Anexo III), mesmo após se ter obtido grandes quantidades de DNA. Por essa razão, o protocolo de extracção foi alterado, adicionando-se um passo de purificação do DNA. Esta alteração não modificou o tempo despendido na extracção, alterando sim a quantidade de DNA extraído, que se apresentou muito inferior à da extracção sem purificação. Este facto deveu-se à substituição do passo de congelação do sobrenadante com etanol a 100% a -20 °C durante 30 minutos, pelo da purificação. O etanol é utilizado para precipitar o DNA. Embora o último passo do processo de purificação também incluía precipitação de material genético com etanol, este tem um teor mais baixo (75%), não tem tempo de repouso e é feito à temperatura ambiente. Daqui pode resultar a diferença na quantidade do DNA extraído pelos dois métodos. As baixas temperaturas ajudam na eficácia da precipitação, e/ou o teor de etanol utilizado também foi um factor importante numa possível fraca precipitação do DNA. Neste caso, também se pode colocar a hipótese de que o tempo de precipitação no método de purificação não é suficiente para se conseguir extrair grandes quantidades de DNA.

Relativamente ao grau de pureza das amostras, 46,1% as amostras de DNA extraídas sem purificação apresentavam valores ideais no rácio  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ . Em contraste, nenhuma das amostras purificadas se encontravam dentro deste parâmetro, e portanto, não puderam ser consideradas puras. Relativamente à contaminação por proteínas e fenóis, os resultados inverteram-se sendo que apenas duas das 13 amostras purificadas apresentaram valores no rácio  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  considerados abaixo do intervalo considerado ideal (1,8-2,2). A partir dos valores deste rácio, 76,9% das amostras extraídas sem processo de purificação encontravam-se contaminadas. Analisando estes resultados, não foi possível concluir qual dos métodos possui maior

sensibilidade para avaliar a pureza da amostra visto que estes dois rácios têm que ser consideradas em conjunto.

Em relação aos 19 isolados em que não foi possível extrair DNA das culturas, a causa de tal facto, pode estar relacionado ou com perdas de material genómico durante os procedimentos da extracção, ou com o DNA extraído não ser suficiente para a reacção de amplificação. Outra das justificações pode prender-se com o facto de a cultura se encontrar contaminada com outras leveduras, mas por falta de tempo, não foi possível confirmar esta hipótese.

Sendo assim, é importante estudar e comparar novos métodos de extracção em alternativa aos usados neste trabalho. Apesar do método mecânico das esferas de vidro ser muito eficaz em muitas espécies de leveduras Basidiomicetas e Ascomicetas (Bolano *et al.* 2001), com alguns isolados não foi possível realizar o estudo de polimorfismos de restrição por falta de DNA. É deste modo relevante adoptar um método de extracção alternativo e ainda mais eficaz, relativamente à quantidade de DNA extraído, à pureza do mesmo e à reprodutibilidade. Na verdade este método apresenta algumas desvantagens, tais como o tempo que requer, e a manipulação de soluções tóxicas que podem ser perigosas tanto para o ambiente como para quem as manipula. Outro facto é que os diversos passos de lavagem e centrifugação aumentam o risco de contaminação da amostra (Mseddi *et al.*, 2011). Apesar de ser importante adoptar outros métodos de extracção de DNA de *C. neoformans*, é preciso ter presente que o isolamento do material genómico deste fungo não é fácil devido à presença da cápsula polissacarídea que, sendo espessa e resistente, torna difícil a lise das células (Mseddi *et al.* 2011).

Os resultados de alguns métodos de extracção em *C. neoformans* foram analisados por Mseddi e seus colaboradores (2011) de modo a obter uma alternativa ao protocolo com fenol e clorofórmio. Como resultado, estes autores observaram que a extracção de DNA através de um novo protocolo usando ureia e resina Chelex<sup>®</sup>, permitiu obter maior quantidade e qualidade de DNA que nos outros métodos, entre eles fenol-clorofórmio e um *kit* comercial, simplificando consideravelmente o protocolo. No artigo de Bolano e colaboradores (2001), o rendimento deste novo protocolo é

considerado dez vezes superior quando comparado com o método mecânico das esferas de vidro.

Em conclusão, seria importante analisar a eficácia deste novo método de extracção de DNA de *C. neoformans* nos isolados da colecção, pois maior eficácia na extracção permitiria melhor visualização dos perfis electroforéticos.

#### 4.3.2 Amplificação do gene *PLB1* de *C. neoformans*

Analizando globalmente, a reacção de amplificação do gene *PLB1* de *C. neoformans* mostrou-se eficaz e reprodutível. Apesar de ter sido otimizada e sofrido algumas modificações, a reacção, bem como os *primers* usados por Latouche *et al.* (2003) e utilizados neste trabalho, mostraram ser adequados para a amplificação do gene. Contudo, verificou-se que a quantidade de DNA amplificado em cada amostra não parecia ser a mesma, afectando assim a visualização das bandas não só na reacção de PCR, como posteriormente na reacção de RFLP. Como já foi referido no tópico anterior, este facto pode estar relacionado com a quantidade e qualidade de DNA obtido na extracção. Para melhorar os resultados, uma hipótese alternativa ao uso de um método de extracção de DNA mais eficaz poderia ser o ajustamento da quantidade ideal de DNA em todas as amostras. Para isso, ter-se-ia de analisar a quantidade de DNA extraído no Nanodrop® em todas as amostras para a poder ajustar antes de realizar a reacção de amplificação. A partir da visualização de uma banda de forte intensidade, ajustar-se-ia a diluição de cada amostra a fim de obter resultados mais semelhantes. Contudo, não houve oportunidade de testar esta hipótese devido ao grande número de amostras estudadas, para saber se esta seria bem-sucedida.

Outra questão importante a ter em conta, prende-se com o cuidado a ter no manuseamento dos reagentes para a reacção. As reacções de PCR exigem quantidades muito precisas de cada um dos reagentes, sendo assim de realçar o cuidado que se deve ter no manuseamento e manutenção das micropipetas utilizadas, devendo estas estar devidamente calibradas. Também é importante salientar a qualidade e pureza dos reagentes, pois contaminações constituem uma das maiores limitações da técnica de PCR.

#### 4.3.3 Polimorfismos de restrição do gene *PLB1* de *C. neoformans*

As estirpes de referência utilizadas foram de extrema importância para o trabalho realizado. Na base de dados das estirpes da colecção PYCC, é possível aceder à informação de cada estirpe, como a sua origem, resultados de testes fisiológicos, sequências de DNA, serotipo e padrões genotípicos resultantes da aplicação de diferentes técnicas moleculares. No entanto, não foi previamente determinado o genótipo das mesmas com a técnica utilizada neste trabalho. Por essa razão, esses isolados foram incluídos neste estudo mas não foram úteis para validar a técnica. Somente as estirpes provenientes da CBS (colecção “WM”) puderam ser utilizadas para validação da genotipagem por RFLP, tanto com o gene *PLB1*, como com o gene *URA5*, devido a terem sido previamente estudadas com estas metodologias, servindo assim de padrão em todos os outros estudos epidemiológicos que usaram a mesma técnica molecular.

Como foi referido anteriormente, durante este trabalho ocorreram duas situações distintas com os isolados WM 179 e WM 628, não tendo sido possível obter imagens electroforéticas relativas aos tipos moleculares correspondentes (VN III e VG I, respectivamente). No caso da primeira estirpe, foi confirmado por testes bioquímicos que a cultura se encontrava contaminada por *C. parapsilosis*. Uma nova cultura liofilizada de WM 179 foi enviada pelo Laboratório de Micologia do Westmead Hospital (Sydney, Austrália), porém esta não cresceu em tempo útil para a realização do trabalho. Com estirpe WM 628, após várias tentativas, conseguiu obter-se amplificação do gene *PLB1*, mas a banda era demasiado ténue para se vir a obter produto de restrição em quantidades necessárias para a sua visualização. Pensa-se que este facto se deveu à pouca quantidade de DNA presente após cada extracção. Por esta razão não foi possível a visualização das bandas no gel de restrição referente a estes dois genótipos, tendo sido utilizada a imagem apresentada em Latouche *et al.* (2003). Apesar dos contratempos, as restantes estirpes de colecção revelaram-se muito úteis para a validação deste trabalho.

De uma forma geral, os resultados obtidos referentes aos tipos moleculares coincidiram com os descritos noutros trabalhos. O tipo molecular VN I tem sido referido como responsável pela maioria das infecções a nível mundial, principalmente

em pacientes imunocomprometidos (Kidd *et al.* 2001; Casali *et al.* 2003; Meyer *et al.* 2003; Tay *et al.* 2006; Trilles *et al.* 2008; Frasés *et al.* 2009). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo, pois este foi o genótipo mais prevalente entre os isolados estudados. O segundo tipo molecular mais prevalente, tanto a nível de todos os isolados, como em relação a apenas aos isolados portugueses, foi VN III correspondente às estirpes híbridas AD entre *C. neoformans* var. *grubii* (A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (D). Estes resultados não são surpreendentes, visto esta elevada frequência ter já sido descrita em outros países do Sul da Europa, como Espanha, Itália, França e Grécia (Viviani *et al.* 2006; Frasés *et al.* 2009; Meyer & Trilles 2010), mas também no Chile (Meyer *et al.* 2003). Estes últimos autores justificam esta similaridade com a elevada colonização Europeia neste país da América Latina. A elevada prevalência de estirpes híbridas AD tem sido até agora descrita como restrita a algumas regiões, e é explicada pela existência das duas formas diplóides na mesma área geográfica (Frasés *et al.* 2009). Esta justificação não só se aplica ao nosso estudo, onde se verifica uma presença significativa do tipo molecular VN IV, como também é corroborado pelos estudos referidos anteriormente. O trabalho de Kidd *et al.* (2001), é uma excepção, pois não identificaram este tipo molecular entre os isolados estudados, podendo tratar-se de casos não autóctones (alóctones).

As infecções por *C. gattii* têm sido reportadas como sendo substancialmente menos comuns (Meyer & Trilles 2010), mas dentro dos quatro genótipos desta espécie, o tipo molecular VG I tem-se mostrado mais prevalente em todo o mundo (Casali *et al.* 2003; Tay *et al.* 2006; Frasés *et al.* 2009). Meyer e Trilles (2010) referem que *C. gattii* raramente é isolado de pacientes ou de fontes ambientais na Europa, facto que é corroborado neste trabalho, não tendo sido identificada esta espécie nos isolados clínicos e ambientais portugueses desta colecção. Contudo, a presença de estirpes de *C. gattii* pode vir a ser identificada, pois assume-se que o nicho ecológico desta espécie se tem expandido de áreas tropicais e sub-tropicais para as regiões de clima temperado, nomeadamente na Europa (Meyer *et al.* 2003).

Quanto aos isolados clínicos não-portugueses incluídos neste estudo, é importante referir que não será possível formular conclusões sobre a epidemiologia da criptococose nos países dos quais são provenientes, devido ao facto de a amostragem ser muito reduzida (um ou dois isolados de cada zona). Relativamente aos isolados

franceses, foram identificados os tipos moleculares VN III e VN IV, o que está de acordo com estudos de Dromer *et al.* (1993) e Meyer & Trilles (2010), que referenciam uma significativa prevalência destes tipos moleculares como responsáveis por infecções no país. Em contrapartida, nos países africanos, como Angola e Guiné-Bissau, não existem trabalhos realizados nesta área, não sendo, por isso possível relacionar os tipos moleculares identificados neste trabalho com a ocorrência nessas áreas geográficas.

Tanto um dos isolados da Guiné-Bissau como o isolado angolano foram identificados como tendo o genótipo VN I, facto que é esperado, visto este ser o tipo mundialmente mais frequente, como foi referenciado em estudos anteriores. O segundo isolado de origem guineense mostrou ser do tipo VN IV, aquele que tem sido mais descrito no Sul da Europa (Meyer & Trilles 2010) e em alguns países da América Latina, nomeadamente Colômbia e Chile (Meyer *et al.* 2003). Somente com um estudo mais alargado de isolados será possível saber se esse genótipo é autóctone ou se essa estirpe foi importada do sul da Europa. Para apurar a distribuição e ocorrência dos diferentes genótipos no continente africano, seria necessário um estudo mais aprofundado sobre a presença de *C. neoformans* em países africanos, tanto a partir de fontes ambientais como clínicas.

As restantes estirpes estrangeiras são provenientes da Austrália e foram isoladas de fontes ambientais. O isolado CN 150 foi recolhido a partir de uma amostra de eucalipto, e foi identificado como sendo VG I, que está descrito ser o genótipo mais comum nestas árvores (Ellis & Pfeiffer 1990; Sorrell *et al.* 1996; Casadevall & Perfect 1998). A estirpe CN 177 também é VG I, veio igualmente da Austrália, porém não tem indicação da sua origem ambiental.

Os outros sete isolados australianos foram identificados como sendo *C. neoformans* var. *grubii* (cinco), *C. neoformans* var. *neoformans* (um), e estirpe híbrida (uma). Não foram encontrados estudos que relacionassem *C. neoformans* com fontes ambientais. Contudo, os resultados desta genotipagem não são surpreendentes visto que, apesar de *C. gattii* ser um importante agente patogénico na Austrália, a maioria dos casos de infecção humana por criptococose em todo o mundo é causada por *C. neoformans* (Chen *et al.* 2000).

Entre as estirpes da colecção PYCC, o tipo molecular VN I foi, mais uma vez, identificado como sendo predominante e ubíquo. Dois dos isolados deste grupo não possuem informação acerca do país de origem (CN 133 e CN 136), sendo que, do primeiro, também não se sabe a fonte a partir da qual foi isolado, sabendo-se apenas o serotipo. De CN 136 não é conhecido o serotipo, e a sua inclusão neste trabalho foi útil para, pelo menos, determinar o tipo molecular a partir do perfil de restrição do gene *PLB1*. Futuramente poderá ser determinado o seu serotipo para completar a informação sobre esta estirpe de colecção.

A estirpe tipo de *C. neoformans* (CN 137<sup>T</sup>), isolada no século XIX a partir de sumo de fruta fermentado (Li & Mody 2010), também foi identificada como sendo VN I, o que poderá indicar que a ubiquidade desta variedade já é muito antiga. Outras duas estirpes da colecção PYCC, CN 139 e CN 149, foram isoladas de eucaliptos da Austrália e mostraram ser dos tipos moleculares VN I e VG I, respectivamente, resultados que estão de acordo com os resultados dos trabalhos citados anteriormente. O isolado CN 151 é do tipo molecular VN III e também foi isolado a partir deste tipo de árvore, mas desta vez no continente americano. Todavia, não nos foi possível aceder a trabalhos que tivessem estudado a ocorrência e distribuição dos isolados ambientais nos EUA, não havendo assim informação sobre a prevalência deste tipo molecular nestas fontes ambientais.

Relacionando o registo dos serotipos destas estirpes com os tipos moleculares identificados neste trabalho, verificaram-se algumas inconsistências. Das sete estirpes PYCC em relação às quais havia registo do seu serotipo, três apresentaram concordância entre o serotipo e o tipo molecular. Todavia, as restantes quatro apresentaram divergências. Os isolados CN 137<sup>T</sup> e CN 138 estão registados na base de dados da colecção PYCC e CBS como sendo do serotipo D, o que identifica a estirpe como sendo *C. neoformans* var. *neoformans* (VN IV). Contudo, o resultado da análise dos perfis de restrição do gene *PLB1* mostra que este isolado é do tipo molecular VN I (*C. neoformans* var. *grubii*). Com os isolados CN 139 e CN 151 registados como tendo serotipos de *C. gattii*, este trabalho, atribuiu-lhes os genótipos VN I e VN III (*C. neoformans*). Diversos estudos são de opinião de que o serotipo pode não corresponder totalmente com o genótipo obtido, na medida em que a serotipagem, determinada através de uma técnica de aglutinação, nem sempre dá origem a resultados consistentes

(Boekhout *et al.* 2001; Lin & Heitman 2006). Sendo assim, será necessário que em estudos futuros sejam aplicadas novas técnicas mais sensíveis, como por exemplo, sequenciação de algumas regiões genómicas, para melhor caracterização dos serotipos e tipos moleculares. Os autores acima citados não excluem a existência de alguma desordem na divergência entre estirpes do complexo *C. neoformans*/*C. gattii*, o que pode explicar os casos acima referidos. Contudo, outra explicação possível para os resultados discrepantes ao nível da espécie, é a ocorrência de contaminação das culturas destes isolados, no tubo de congelação ou na cultura para extracção, pois as duas determinações foram realizadas com anos de intervalo. De modo a clarificar esta divergência e, para que, em futuros trabalhos estes isolados possam ser usados, seria importante substituir as culturas destas estirpes existentes na colecção por novas culturas originais.

Apesar de estas estirpes serem de uma colecção de referência, não está disponibilizada qualquer informação sobre os tipos moleculares utilizando a metodologia aplicada neste trabalho, e por isso não puderam ser utilizadas como referência, tal como foram utilizadas as estirpes da colecção “WM” para validar a técnica. No entanto, como estas estirpes têm sido alvo de muitos outros estudos, incluindo sequenciação de certas regiões do genoma, continuarão naturalmente a servir de base a futuros trabalhos.

Os isolados clínicos e ambientais portugueses revelaram uma elevada heterogeneidade de tipos moleculares dentro dos quatro tipos de *C. neoformans*, o que está de acordo com os resultados do estudo de Meyer e Trilles (2010), em que 80% das infecções criptocócicas foram causadas por um dos quatro tipos moleculares de *C. neoformans*. Nos isolados estudados neste trabalho, verificou-se uma larga prevalência do tipo molecular VN I, em mais de metade dos isolados clínicos, tanto originários da Grande Lisboa como do Porto (61,05% e 57,50%, respectivamente). Observou-se um elevado número de estirpes híbridas em ambas as regiões, bem como um número significativo de isolados do tipo VN IV. Já VN II foi apenas identificado num número reduzido de isolados.



O tipo molecular VN II não foi detectado no conjunto de isolados ambientais portugueses. O tipo molecular mais prevalente foi o VN I, tal como, de uma maneira geral o é na Europa e América (Meyer & Trilles 2010). Um dos resultados interessantes a referir é a presença significativa de VN III entre os isolados clínicos a qual não é detectada entre as estirpes ambientais portuguesas analisadas neste estudo. Pode então colocar-se a hipótese de que a correlação entre os isolados clínicos e ambientais parece não ser tão directa como se pensava inicialmente. Em Portugal, será necessário realizar mais trabalhos, com maior número de isolados ambientais de preferência em zonas geográficas distintas, a partir de materiais diversos, pois o número de isolados ambientais deste trabalho foi muito reduzido relativamente ao dos isolados clínicos estudados. Somente após um estudo mais alargado será possível conhecer se as fontes ambientais estão directamente relacionadas com casos de infecção de pacientes e conhecer melhor a epidemiologia da criptococose em Portugal.

Meyer e Trilles (2010) referiram a importância de, após se estabelecer a distribuição dos tipos moleculares, se aplicarem métodos mais específicos e sensíveis, como a técnica de MLST, para investigar a diversidade populacional de *C. neoformans* e *C. gattii* a nível global. Estes estudos permitiriam investigar fenómenos a recombinação genética e monitorizar a dispersão genética entre populações, bem como de genótipos individuais, ou eventualmente de estirpes muito virulentas que possam emergir numa dada área geográfica.

Relativamente aos isolados obtidos a partir do mesmo paciente, seja ao longo da infecção, seja a partir de amostras clínicas diferentes no mesmo momento da infecção, identificou-se em alguns casos, mais do que um genótipo diferente, sugerindo a existência de infecções mistas. Este facto está em concordância com estudos anteriores (Igreja *et al.* 2004, Lin & Heitman 2006), nos quais os primeiros autores identificaram cinco estirpes de *C. neoformans* var. *grubii* (VN I) e uma estirpe de *C. gattii* (VG II) isolados do mesmo paciente.

Todavia, as diferenças nos genótipos de isolados dos mesmos pacientes não se verificam em todos os casos de infecção na medida em que, na maioria, os isolados que foram obtidos do mesmo doente se mostraram genotipicamente idênticos. Pensa-se

assim que, nestes casos, os pacientes estavam infectados por apenas um tipo molecular de *C. neoformans* (VN I, VN III ou VN IV). Em 13 casos, foram isoladas estirpes a partir de produtos diferentes do mesmo paciente e essas estirpes eram todas do mesmo genótipo, indicando que a infecção foi provocada pela mesma estirpe. Nenhum dos isolados clínicos estudados apresentou genótipo VG, logo não houve referência a infecções por *C. gattii*.

Diversos estudos corroboram os resultados acima referidos (Desnos-Ollivier *et al.* 2010; Guinea *et al.* 2010; Mlinaric-Missoni *et al.* 2011). Apesar de apenas se retirar uma colônia a partir das culturas obtidas a partir das amostras clínicas, Guinea e os seus colegas (2010) pensam que os episódios de criptococose podem ser causados por mais do que uma estirpe de *C. neoformans*, incluindo estirpes de genótipos diferentes, sugerindo assim que esta infecção possa dever à co-infecção de múltiplos genótipos. Têm sido desenvolvidas duas explicações para explicar este facto. O primeiro, é a hipótese de que o paciente possa ter sido reinfectado com estirpes de *C. neoformans* distintas durante e/ou depois da infecção inicial, ou que uma das estirpes causadoras da infecção primária seja mais persistente do que a outra (Haynes *et al.* 1995). Por outro lado, esta diferença de genótipos também pode ser devida à instabilidade do cariótipo durante o período da infecção, sendo que no modelo murino se observaram deleções e rearranjos cromossómicos (Fries *et al.* 1996).

Grande parte dos estudos de genotipagem de estirpes de *C. neoformans* e *C. gattii* têm sido realizados utilizando a técnica de RFLP do gene *URA5*. O trabalho de Latouche *et al.* (2003) foi o primeiro a analisar a potencialidade do gene *PLB1* para estudos de tipagem molecular destas estirpes. Alguns isolados da colecção aqui estudada já tinham sido genotipados com base no gene *URA5*, resultados que foram apresentados no estudo de Silva (2010) e noutros ainda não publicados. Em 170 isolados, 72,9% apresentaram concordância na genotipagem por RFLP dos dois genes, mas verificaram-se diferenças em 46 isolados. Aproximadamente 70% destas pertencem aos tipos moleculares VN I, VN III e VN IV. Sabe-se que o genoma das estirpes híbridas AD de *C. neoformans* é muito complexo e diverso. No recente estudo de Li *et al.* (2012), os autores observaram que a organização genómica das estirpes híbridas AD

é muito dinâmica e apresenta uma elevada plasticidade. O facto de possuírem sequências únicas relativamente aos isolados que lhes deram origem (sequências das estirpes do serotipo A e das estirpes do serotipo D), gera uma diversidade populacional bastante significativa (Li *et al.* 2012). Todavia, apesar de apenas cerca de 0,2% do genoma possuir 98,5% de semelhança com os genomas dos serotipos A e D (Kavanaugh *et al.* 2006), estas divergências poderão estar relacionadas com a homozigotia das estirpes híbridas. Tratando-se de trabalhos realizados com dois genes diferentes, *URA5* e *PLB1*, é plausível que a informação genética entre eles seja diferente, facto que se pode reflectir quando se pretende genotipar as estirpes. Uma outra hipótese para justificar estas diferenças é o facto de já terem sido verificadas *in vitro* mudanças fenotípicas e genotípicas resultantes da adaptação a condições laboratoriais (Franzot *et al.* 1998). Estes autores alertam para os cuidados a ter durante a manutenção e armazenamento dos isolados.

Foram encontradas outras diferenças, nomeadamente entre os tipos moleculares VN I e VN II de *C. neoformans*, e VG I e VG III de *C. gattii*. Tratando-se de genes diferentes é possível que a genotipagem de estirpes sofra ligeiras alterações. Contudo, nestes casos específicos as diferenças de genótipos não afectam a identificação das espécies e variedades implicadas, já que VN I e VN II pertencem à var. *grubii* de *C. neoformans*, e de VG I e VG III serem da espécie *C. gattii*. Todavia, estas discrepâncias na genotipagem em função do gene alvo deveriam ser investigadas. Provavelmente, o estudo das sequências dos dois genes nesses isolados poderão permitir esclarecer as divergências de genotipagem e seleccionar qual o melhor método de genotipagem de estirpes do complexo de espécies *C. neoformans*.

Outras duas estirpes, pertencentes à colecção PYCC (CN 139 e CN 151) também deram origem a perfis de tipos moleculares diferentes, se compararmos a genotipagem com os genes *URA5* e *PLB1*. Pelo gene *URA5*, foram identificados perfis de restrição de *C. gattii* (VG III e VG II, respectivamente) e, pela análise com o gene *PLB1*, foram registados os perfis VN I e VN II de *C. neoformans*, respectivamente. No entanto, estas estirpes de referência estão registadas na base de dados tanto da colecção PYCC como CBS, como sendo do serotipo B, ou seja, da espécie *C. gattii*. O mais provável foi ter ocorrido contaminação da cultura quando da análise do gene *PLB1*, pelo que o mais correcto seria requisitar novas culturas da colecção PYCC e confirmar o seu perfil

molecular em ambos os genes, substituindo assim as culturas correspondentes na colecção do laboratório.

Em conclusão, aparentemente este é o primeiro estudo que compara os resultados da genotipagem de isolados de *C. neoformans* através do estudo dos perfis de restrição do gene *PLB1* com os perfis de restrição do gene *URA5*. No futuro, seria de extrema relevância que algum trabalho de investigação analisasse e esclarecesse as discrepâncias aqui encontradas, e determinasse se algum dos dois genes possui maior capacidade de discriminação do que o outro na genotipagem destas leveduras patogénicas. Também seria crucial poder complementar esta análise com isolados pertencentes a colecções de outros países e de outras áreas geográficas.

#### 4.3.4 Análise comparativa

Os perfis de RFLP de todos os isolados clínicos e ambientais, e das estirpes de referência, foram combinados num dendrograma (Anexo IV e Figura 20). Foi adoptado o coeficiente de Dice que, com base nas diferenças entre as bandas dos perfis electroforéticos, permite criar *clusters* distintos com base no número de bandas divergentes nos perfis electroforéticos. Os isolados do tipo molecular VG I encontram-se agrupados num *cluster* distinto dos restantes, seguido de VG IV, explicado pelo facto de possuírem um maior número de bandas diferentes entre si (quatro). Como não se verificou a existência de isolados VG III, o único isolado representante deste tipo molecular foi a estirpe de referência WM 161, que ficou isolada entre os dois *clusters* de *C. neoformans* VN II e VN IV, por apresentarem no perfil três bandas de diferença entre eles. Os isolados de genótipos VN I e VG II são, de acordo com este coeficiente, mais próximos pois possuem um perfil de RFLP muito semelhante, divergindo em apenas uma banda ( $\approx 450$  pb).

Observando mais detalhadamente o dendrograma, é possível verificar que dentro de alguns dos *clusters* criaram-se sub-*clusters*, nomeadamente em VN I (três), VN II (dois), VN III (dois) e VN IV (quatro). Este facto pode ser explicado pelas diferenças que podem ter ocorrido durante as corridas dos géis de restrição, pois estas foram realizadas em dias diferentes. Devido à instabilidade da corrente eléctrica, os géis apresentaram ligeiras diferenças durante a corrida, o que afectou a posição das bandas

em alguns milímetros. Mesmo com tolerâncias elevadas, de modo a tentar minimizar estas alterações, a criação de sub-*clusters* levou à divisão dos isolados dentro do mesmo grupo molecular. Outra possibilidade, suportada por Kidd *et al.* (2001), é que a criação destes sub-*clusters* possa estar relacionada com alguma heterogeneidade genética entre o grupo, podendo apenas ser comprovada por sequenciação.

Analisando cada isolado, observa-se que alguns dos resultados na análise comparativa não são os esperados. O agrupamento de cada isolado em função dos tipos moleculares mostra algumas discrepâncias, que podem ser à partida devidas à entropia causada pelo elevado número amostras ( $n=276$ ). O caso que pode ser evidenciado é a inclusão do isolado CN 283 (VN I) no *cluster* de VN III, o qual pode dever-se a uma falha na identificação das bandas do perfil por parte do *software*, marcando assim a única banda que diferencia os dois perfis ( $\approx 600$  pb).

Comparativamente a outros estudos (Kidd *et al.* 2001; Meyer *et al.* 2003), a percentagem de tolerância padronizada neste trabalho foi muito elevada (0,8 e 0,9%, respectivamente, em comparação com 3,50%) o que pode estar relacionado com alguns casos de agrupamento não esperados, como referido anteriormente. Apesar de, no trabalho de Kidd *et al.* (2001), ter sido usado o mesmo coeficiente e o mesmo algoritmo que neste trabalho, não é possível tirar conclusões semelhantes, tais como, sugerir diferenças genéticas entre isolados, ou uma relação geográfica entre os padrões de isolados clínicos e ambientais. Uma hipótese para este facto será o tamanho da amostra ( $n=17$ ) do trabalho de Kidd e os colaboradores (2001) que, juntamente com o valor de tolerância utilizada, permite uma análise epidemiológica mais rigorosa do que a obtida neste trabalho. De futuro, seria importante conceber este dendrograma usando padrões de tolerância mais baixos, bem como tentar utilizar outro método alternativo ao UPGMA. Uma hipótese seria o método de neighbor-joining, que assenta no conceito de uma matriz de distâncias (Saitou & Nei 1987; Viana 2007). Seguindo o que Meyer e (2003) realizaram no seu estudo, seria uma mais valia analisar se existe dispersão genética entre os isolados contidos nos sub-*clusters*. Os mesmos autores, tendo um número de amostras semelhante ao estudado neste trabalho, excluíram da sua análise alguns padrões que consideraram ter sido obtidos em condições electroforéticas diferentes. Esta seria uma possibilidade para o caso presente, visto numa amostra tão extensa como esta ser difícil fazer comparação entre estes casos específicos.

Em suma, comparando os resultados da análise comparativa publicados noutros estudos com os obtidos neste trabalho, conclui-se sobre a impossibilidade de, por esta via, se poder realizar uma análise filogenética mais rigorosa. Em futuras análises filogenéticas seria importante comparar os métodos de neighbor-joining e UPGMA que, partindo de pressupostos ligeiramente diferentes, são frequentemente utilizados em trabalhos de investigação, evidenciando diferentes ligações epidemiológicas.

#### 4.4 Estudo da sensibilidade aos antifúngicos, pelo método de Kirby-Bauer

Os resultados obtidos neste trabalho relativos ao estudo da sensibilidade aos antifúngicos mostram concordância com o que foi descrito por outros autores noutros estudos. É necessário realçar que a maioria dos estudos sobre susceptibilidade aos antifúngicos utiliza um método diferente do utilizado neste trabalho, adoptando principalmente o método de microdiluição. No entanto, o método de difusão de disco, igualmente padronizado pelo CLSI, tem-se mostrado vantajoso na avaliação da susceptibilidade antifúngica dos microrganismos patogénicos emergentes (Pfaller *et al.* 2009), por ser económico e de muito fácil realização (Rex *et al.* 2001). Apesar de se usarem os valores padrão estabelecidos para *Candida* sp., os resultados obtidos por este método mostram boa correlação com os obtidos pelos outros métodos de referência (Rex *et al.* 2001). Pfaller e colaboradores (2009) admitem, que no futuro, será necessário realizar um ajustamento destes valores para leveduras de espécies não-*Candida*.

Neste trabalho, uma elevada percentagem dos isolados estudados mostrou ser susceptível aos dois antifúngicos testados, resultado que é corroborado por diversos estudos realizados em diferentes países (Archibald *et al.* 2004; Pfaller *et al.* 2004, 2009; Trilles *et al.* 2004; Souza *et al.* 2005; Guinea *et al.* 2010; Mlinaric-Missoni *et al.* 2011). Esses trabalhos verificaram que fluconazol e voriconazol são eficazes contra *C. neoformans*. Todavia, alguns estudos detectaram valores de CMI superiores para fluconazol, e que o voriconazol possui uma actividade antifúngica mais eficaz para este fungo (Pfaller *et al.* 2004, 2009; Souza *et al.* 2005; Sabatelli *et al.* 2006). Este facto também se verifica nos resultados obtidos neste estudo, observando-se uma elevada percentagem de resistências relativamente ao fluconazol (32,7%) considerando todos os isolados testados, bem como a emergência de isolados susceptíveis dependendo da dose (15,3%). Estas conclusões também se observaram em estudos de Bedout *et al.* (1999), Pfaller *et al.* (2005 e 2009) e Torres-Rodríguez *et al.* (2008), que observaram a emergência de resistências não só ao fluconazol, mas também a outros antifúngicos habitualmente utilizados no tratamento das infecções por *C. neoformans*, como anfotericina B, flucitosina e itraconazol. Estes autores explicam estes resultados com o facto da utilização generalizada destes antifúngicos na terapêutica, incluindo a profilática, que por vezes é prolongada (Pfaller *et al.* 2005). Há autores que afirmam

não existirem diferenças na susceptibilidade entre estirpes isoladas de pacientes VIH-negativos e VIH-positivos (Guinea, 2010). Contudo, existem casos em que a maioria da resistência relatada nos isolados testados está associada a pacientes VIH-positivos (Torres-Rodríguez *et al.* 2008), pois o fluconazol é considerado como o fármaco de primeira linha tanto para a profilaxia da infecção como para a manutenção do tratamento (Bedout *et al.* 1999). Esta análise não foi possível nos isolados estudados devido à falta de informação sobre o estado imunológico da maioria dos pacientes a partir dos quais foram isoladas as leveduras. Somente de um pequeno número é que se possui essa informação. Os resultados preocupantes sobre a diminuição da sensibilidade a estes antifúngicos resultaram num elevado número de investigações para encontrar alternativas mais eficazes para o tratamento da criptococose. Além do voriconazol, o posaconazol e o isavuconazol demonstraram uma excelente actividade *in vitro* e perfis farmacocinéticos favoráveis em relação a um largo número de fungos patogénicos, sugerindo assim uma nova geração de triazóis a utilizar como alternativa aos anteriores (Pfaller *et al.* 2004; Sabatelli *et al.* 2006; Thompson *et al.* 2009).

Analisando os isolados clínicos portugueses, a resistência aos antifúngicos testados verifica-se maioritariamente nos provenientes de hospitais da Grande Lisboa em relação ao fluconazol (44%), tendo sido observada uma situação de susceptibilidade dependendo da dose num dos isolados do Porto. Não há conhecimento da realização de estudos anteriores sobre a susceptibilidade deste organismo em Portugal, pelo que não é possível relacionar os resultados obtidos com a situação portuguesa relatada anteriormente. No entanto, este trabalho é um ponto de partida para o conhecimento da actividade dos antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose. Observou-se que os isolados de *C. neoformans* apresentam elevadas taxas de resistência ao fluconazol, sendo que o voriconazol se pode tornar uma boa alternativa no tratamento destas infecções. Na realidade, somente um número reduzido de isolados é que mostrou resistência a este fármaco. Complementando estes resultados com a informação adicional disponível sobre o tratamento em alguns pacientes, foi possível observar uma tendência para a aquisição da resistência ao fluconazol durante o tratamento. Este facto foi verificado com os isolados CN 40 e CN 41, os quais foram obtidos do mesmo paciente que estava a receber tratamento com este antifúngico, e os dois isolados mostraram ser resistentes com valores máximos de CMI ( $> 165 \mu\text{g/ml}$ ). Outro caso



relaciona-se com o isolado CN 120, em que se sabe que o paciente estava a receber profilaxia com fluconazol e o isolado é susceptível dependendo da dose. Não foi possível tirar conclusões sobre variações de susceptibilidade ao longo de um dado período de infecção, porque a selecção das estirpes para os estudos de sensibilidade foi de certa forma aleatória e, por esse motivo, não foi estudada a ocorrência de alterações de susceptibilidade ao longo do tempo.

Com a finalidade de poder ajustar a terapêutica para esquemas mais eficazes do ponto de vista clínico e económico, considera-se importante a criação de grupos de investigação que monitorizassem continuamente a susceptibilidade aos antifúngicos, habitualmente utilizados no tratamento das infecções, tal como por exemplo a sensibilidade à anfotericina B.

Relativamente aos isolados ambientais, detectou-se que o isolado proveniente de Vila Real é resistente ao fluconazol (mas não ao voriconazol) tendo a CMIs deste isolado o valor mais elevado ( $> 165 \mu\text{g/ml}$ ). Sobre este facto, existe uma hipótese explicativa, a qual está relacionada com a origem dessa resistência. Estudos de resistência a azóis para isolados de *C. neoformans* têm demonstrado que essa perda de susceptibilidade está associada a mudanças na afinidade da enzima alvo. A este facto dá-se o nome de resistência extrínseca ou secundária, pois o desenvolvimento da resistência dá-se em resposta à exposição à droga durante o tratamento (Perea & Patterson 2002). Contudo, neste caso, estamos perante um isolado ambiental, o qual claramente não foi submetido à acção de qualquer antifúngico. Assim, parece que se pode afirmar que se trata então de resistência intrínseca ou primária, pois a levedura já é naturalmente resistente. Esta situação é explicada por White e colaboradores (1998), que sugerem a existência de uma alteração num gene relacionado com a acção do antifúngico. A análise de esteróis (alvo de inibição dos azóis) em *C. neoformans*, sugere que a resistência ao fluconazol pode estar relacionada com um defeito num dos genes *ERG 2* ou *ERG 3*. Para confirmar esta hipótese, seria importante analisar, no futuro, o genoma deste isolado e verificar quais os factores que poderiam estar relacionados com a resistência ao fluconazol, testando a eficácia de outros antifúngicos, visto que essas alterações genéticas também poderão estar relacionadas com a resistência à anfotericina

B (White *et al.* 1998). Estes estudos poderão ser muito importantes, tanto para humanos como para animais, na medida em que podem ser inalados, pelo hospedeiro humano, basidiósporos de estirpes naturalmente resistentes, causando infecções difíceis de controlar devido à menor eficácia do tratamento.

Sobre os isolados estrangeiros incluídos nestes testes, e devido à amostra estudada ter sido reduzida, não é possível extrapolar os resultados obtidos neste trabalho para a situação epidemiológica que deve estar a ocorrer nos respectivos países de origem. Os dois isolados da Guiné-Bissau que foram estudados são susceptíveis aos dois antifúngicos testados. Pfaller e os seus colaboradores (2005) assumem que estirpes oriundas de África são maioritariamente susceptíveis a vários antifúngicos, em grande parte devido à menor acessibilidade e exposição a estes agentes devido às condições económicas e de saúde desses países. Contrastando com estes resultados, os dois isolados clínicos provenientes de França são resistentes ao fluconazol (um na categoria de susceptível dependendo da dose) e um ao voriconazol. Estes dados também podem ser explicados através da disponibilidade de acesso que os países mais desenvolvidos têm às diferentes possibilidades de tratamento, sendo que a emergência das resistências deverá ser uma preocupação nesses países (Bedout *et al.* 1999; Pfaller *et al.* 2005, 2009; Torres-Rodríguez *et al.* 2008). No caso dos isolados ambientais australianos, apenas um deles se mostrou resistente ao fluconazol, pelo que a estes se pode aplicar o que foi referido anteriormente para os isolados ambientais portugueses.

Um caso semelhante foi observado com as estirpes de referência estudadas. Uma estirpe ambiental (CN 151), proveniente de uma árvore de eucalipto dos EUA, mostrou ser resistente ao fluconazol. Foram observados sucessivos casos, de isolados ambientais resistentes, na sua maioria ao fluconazol, mas também alguns ao voriconazol, provenientes de regiões geográficas distintas. Sugere-se veementemente que a resistência primária é uma realidade e que ocorre mais frequentemente do que seria desejável. Estes casos podem comprometer a eficácia dos tratamentos actualmente disponíveis para criptococose, sendo deste modo, imperativa a realização de mais

investigações sobre a susceptibilidade/resistência de isolados ambientais e a compreensão dos mecanismos de resistência.

Com as estirpes de referência da colecção “WM” também se observaram casos de resistência na maioria em isolados clínicos da Austrália e de pacientes VIH-positivos. Tal como já foi referido anteriormente, esta situação não é de estranhar dado que o uso de agentes antifúngicos em regimes terapêuticos prolongados, em pacientes imunologicamente debilitados, conduz ao desenvolvimento de resistência secundária (Archibald *et al.* 2004). Perea & Patterson (2002) afirmam que o número de recidivas de meningite criptocócica em pacientes com SIDA tem vindo a aumentar devido ao desenvolvimento de resistência secundária a azóis, especialmente ao fluconazol, apesar de o uso da terapia HAART reduzir substancialmente a probabilidade de reincidência.

Um caso interessante relaciona-se com a estirpe WM 779, isolada de uma chita da África do Sul. Esta estirpe mostrou ser resistente ao fluconazol, mas não ao voriconazol. Não se possui informação adicional sobre o animal, mas o mais provável é que vivesse em meio selvagem, sem acesso a drogas antifúngicas, e que a infecção tenha sido adquirida por uma estirpe ambiental presente no seu habitat natural. É muito provável, portanto, que se trate de uma estirpe ambiental naturalmente resistente (resistência primária).

Khan e seus colaboradores (2007) afirmam que a ocorrência de resistência primária em isolados ambientais é rara. Do total de isolados estudados, pelo menos seis dos isolados parecem ter sofrido este processo e, apesar de este número poder não ser considerado significativo, é um alerta para realizarem estudos adicionais e esclarecer a situação actual.

Em relação aos 33 pacientes dos quais se possui mais do que um isolado, obtidos em diferentes alturas da infecção, foi testada a susceptibilidade de, pelo menos, dois isolados de seis destes pacientes. Entre estes, existem dois casos de infecções em que foram isoladas estirpes de genótipos diferentes (pacientes #2 e #3) os quais exibiram diferentes valores de susceptibilidade. No caso do paciente #2, um dos isolados é resistente.

Os restantes casos relacionam-se com pacientes nos quais foi identificado o mesmo tipo molecular nos vários isolados. Nestes casos é mais provável que o isolado inicial possa ter persistido durante o tratamento, do que o doente ter sido infectado por uma nova estirpe (Mlinaric-Missoni *et al.* 2011). Estas recidivas podem dever-se à fraca acção da droga, visto a estratégia de tratamento adoptada poder não ter sido a mais indicada para erradicar a infecção inicial, bem como à posterior deterioração do sistema imunitário (Casadevall *et al.* 1993).

Mlinaric-Missori e colaboradores (2011) verificaram a ocorrência de uma diminuição na susceptibilidade dos isolados do mesmo genótipo a alguns antifúngicos, incluindo ao fluconazol, devido à microevolução que ocorre nos isolados de *C. neoformans* no decurso da terapêutica. Este facto também foi verificado nos isolados testados, com a excepção dos isolados correspondentes ao paciente #11, nos quais se verificou uma diminuição das CMI. Os mesmos autores afirmam também que essas diferenças não são verificadas nos testes de susceptibilidade ao voriconazol. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram o contrário, pois verificou-se um aumento da CMI na maioria dos casos.

Concluindo, a CMI pode variar significativamente entre os isolados provenientes do mesmo paciente ao longo da infecção, sendo assim essencial tipar as estirpes para que seja possível distinguir entre estirpes persistentes e estirpes adquiridas (Casadevall *et al.* 1993).

De uma maneira geral, neste trabalho verificou-se uma potencialidade mais elevada do voriconazol para o tratamento da criptococose e a emergência da resistência ao fluconazol, cuja utilização como fármaco de primeira linha deveria ser mais moderada. Em futuros estudos, outros antifúngicos deveriam ser testados para uma melhor compreensão da sua eficácia relativamente à susceptibilidade dos isolados em Portugal.

Testar a susceptibilidade dos isolados ambientais pode servir para avaliar os padrões de susceptibilidade dos isolados clínicos de algumas áreas geográficas, pois a exposição de indivíduos imunocomprometidos a propágulos ambientais de *C. neoformans* pode estar associada a um maior risco de infecção na população (Souza *et*

*al.* 2005). Neste trabalho, verificaram-se alguns casos de resistência primária em isolados ambientais, que deverão ser um ponto de partida para investigações futuras e maior aprofundamento do tema das resistências, e poder assim realizar uma vigilância no que acontece com os isolados clínicos.

#### 4.5 Análise estatística

Diversos estudos têm constatado que existem diferenças na susceptibilidade aos antifúngicos entre as duas espécies do complexo *C. neoformans* (Trilles *et al.* 2004; Khan *et al.* 2007; Iqbal *et al.* 2010), e até mesmo entre as variedades de *C. neoformans* (Feng *et al.* 2008). Khan e os seus colegas (2007) referem que estas diferenças estão relacionadas com a capacidade das estirpes sintetizarem melanina, a qual, quando presente na célula, impede o acesso da droga antifúngica ao centro activo. No entanto, apenas se identificaram três isolados de *C. gattii* na colecção estudada (todos ambientais), e realizaram-se testes de susceptibilidade em apenas dois. É possível concluir que o fluconazol e o voriconazol é uma droga eficaz *in vitro* contra esta espécie. Porém, é necessário estar atento a casos de resistência nos isolados ambientais pois se estas estirpes causarem infecção em humanos, a resposta ao tratamento de *C. gattii* é menos eficiente do que em *C. neoformans* (Trilles *et al.* 2004). O estudo de Iqbal *et al.* (2010) frisa também a importância de melhor compreensão da correlação entre as CMIs dos diferentes isolados ambientais e clínicos e o sucesso clínico e terapêutico das infecções.

Comparativamente a outros estudos (Iqbal *et al.* 2010; Trilles *et al.* 2012), não é possível estabelecer uma correlação da susceptibilidade aos antifúngicos testados com *C. neoformans* e as estirpes de *C. gattii* identificadas neste trabalho devido ao número muito reduzido de estirpes estudadas.

Das correlações efectuadas, em todas elas não se obteve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os testes com fluconazol, assim como em dois casos relativos ao voriconazol (VN I-VN IV e VN III-VN IV). Relativamente a estes últimos, é de constatar que os poucos casos de resistência se concentram nestes tipos moleculares (com excepção de VN I). Apesar de serem em tão reduzido número (n=3), é possível que contribuam para a alteração da média das CMIs do tipo molecular correspondente, fazendo com que a diferença entre elas não seja estatisticamente significativa (p=0,843).

Esta hipótese não é aplicável para a correlação entre VN I e VN IV, pois não se registam casos de resistência no primeiro. Todavia, a explicação para a não significância da diferença das CMIs entre ambos (p=0,070) pode estar relacionada com a identificação de dois isolados resistentes em VN IV, portanto, apesar da discrepância

dos tamanhos das amostras entre os dois grupos (n=51 e n=11, respectivamente), estes dois isolados podem ter aumentado os valores de CMI. Por essa razão, não é possível assumir uma diferença entre estes tipos moleculares. Por outro lado, em relação ao fluconazol, a elevada taxa de resistência a este antifúngico está distribuída pelos vários tipos moleculares de *C. neoformans*. Possivelmente, por esta razão, não podem ser avaliadas as diferenças de CMI entre estes tipos moleculares.

Trabalhos de outros autores, referem que as estirpes de *C. neoformans* var. *grubii* (VN I e VN II) apresentam maior número de resistências ao fluconazol do que as de *C. neoformans* var. *neoformans* (VN IV) (Feng *et al.* 2008). No entanto, essas conclusões não foram comprovadas neste estudo. De momento, ainda não são conhecidos estudos que tenham correlacionado os tipos moleculares de *C. neoformans* com a susceptibilidade ao voriconazol. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que existem diferenças de susceptibilidade entre tipos moleculares de *C. neoformans* relativamente a este antifúngico. É possível que estas diferenças também possam ser significativas relativamente a outras drogas antifúngicas, como já foi verificado nos trabalhos realizados por Iqbal *et al.* (2010) e Trilles *et al.* (2012) com isolados de *C. gattii*. Seria importante que futuros estudos se dedicassem a este assunto, incluindo outras colecções noutras países e continentes. Fica aqui mais uma vez assinalada, a relevância da tipagem molecular ser inserida no diagnóstico de rotina e complementada com testes de susceptibilidade, para que seja aplicada a terapia mais adequada a cada caso clínico.

**Considerações finais:**

Desde o final dos anos 90, a criptococose tornou-se uma infecção frequente em muitas regiões do mundo (Casadevall & Perfect 1998). Os agentes etiológicos, *C. neoformans* e *C. gattii*, têm ganho importância crescente a nível hospitalar pela gravidade da infecção causada, por se disseminar por diversos órgãos, em especial para o SNC (Lin & Heitman 2006). A via de transmissão está relacionada com fontes ambientais variadas (solo contaminado por fezes de pombo, eucaliptos e madeira em decomposição), com as quais humanos e animais mantêm contacto (Li & Mody 2010).

Ao longo dos últimos anos, a biologia molecular tem-se revelado crucial para o estudo da ocorrência e distribuição de *C. neoformans*, tanto em casos clínicos como em contaminações ambientais.

Neste trabalho, um número alargado de estirpes do complexo de espécies de *C. neoformans* de origem clínica e ambiental foi genotipado, o que possibilitou conceber uma representação epidemiológica mais fundamentada da criptococose, e da distribuição dos seus agentes patogénicos no nosso País, a qual contribuiu para um melhor conhecimento da sua ocorrência na Europa e do Mundo. A utilização dos polimorfismos de restrição do gene *PLB1* permitiu confirmar que o tipo molecular VNI de *C. neoformans* é o mais abundante entre os isolados analisados, seguido de VN III, correspondente às estirpes híbridas, e VN IV. Esta constatação está de acordo com os resultados obtidos na maioria dos estudos realizados noutras regiões do globo, mesmo naqueles que utilizaram outros genes alvo, como o gene *URA5*. Esse gene tem sido analisado na grande maioria dos estudos realizados a nível global, sendo actualmente o de Latouche e os seus colegas (2003) o único realizado com o gene *PLB1*, estando esta abordagem, portanto, ainda muito inexplorada. Este trabalho teve como objectivo, explorar este gene como alvo de uso para genotipagem de estirpes de *C. neoformans*, realizando também uma comparação com os resultados obtidos usando o gene *URA5* (obtidos previamente no nosso laboratório), observando-se em alguns casos, discrepâncias entre os resultados pelas duas abordagens. Neste âmbito, novos estudos deverão realizar-se, para que seja possível conhecer melhor o genoma de *C. neoformans* e a determinar a melhor metodologia de genotipagem das suas estirpes.



Nos isolados portugueses, o tipo molecular VN I foi o mais prevalente, tanto em fontes ambientais como clínicas, e de proveniências geográficas distintas. Dos isolados clínicos, as prevalências dos tipos moleculares de *C. neoformans* foram semelhantes entre as regiões da Grande Lisboa e Porto. Relativamente aos isolados ambientais, foi identificado o tipo molecular VN IV em Vila Real, enquanto que todos os isolados ambientais de Lisboa foram identificados como sendo do tipo molecular VN I.

Neste trabalho também foram genotipados isolados clínicos e ambientais provenientes de outros países. Tratando-se de casos pontuais, não foi possível estabelecer-se uma ligação epidemiológica às áreas geográficas das quais foram provenientes. Todavia, foi possível observar mais uma vez, a prevalência do tipo molecular VN I, confirmando a sua predominância global, e a ocorrência de isolados de *C. gattii* provenientes de fontes ambientais da Austrália.

A avaliação da susceptibilidade antifúngica dos isolados genotipados também foi alvo de análise neste trabalho. Verificou-se uma elevada percentagem de susceptibilidade ao voriconazol (96,9%), contrariamente ao registado com fluconazol, em relação ao qual, quase metade dos isolados é susceptível dependendo da dose ou mesmo resistente. Estes resultados são corroborados por outros estudos realizados internacionalmente, nos quais o aumento da resistência ao fluconazol é uma preocupação, demonstrando a importância deste tipo de testes para a monitorização da infecção, de forma a adequar o tratamento ao paciente, e por conseguinte a eficácia do mesmo. Tal como noutros estudos, os resultados obtidos neste trabalho permitiram detectar diferenças de susceptibilidade entre tipos moleculares de *C. neoformans*. Relativamente ao voriconazol, o tipo molecular VN II mostrou-se mais susceptível que os restantes tipos moleculares de *C. neoformans*, tal como VN III revelou-se mais resistente que VN I. Contudo, não se verificaram diferenças significativas na susceptibilidade entre os tipos moleculares e *C. neoformans* quanto ao fluconazol, contrariamente ao estudo realizado por Feng *et al.* (2008).

Como reflexão sobre os resultados apresentados neste trabalho, considero que seria importante completar a investigação com um maior número de isolados provenientes de outras regiões de Portugal, de modo a haver uma vigilância mais acurada da criptococose, bem como uma avaliação da sua ocorrência ao longo dos anos.

Outra mais-valia para trabalhos futuros, seria a colheita de isolados animais, os quais, baseado em Iqbal *et al.* (2010), podem servir como casos sentinela para infecções humanas numa área geográfica restrita. Devido ao fenómeno da globalização que ocorre actualmente, é crucial haver conhecimento sobre a epidemiologia e ocorrência de determinadas estirpes de outros países. Com a aplicação de técnicas moleculares, como MLST, é possível relacionar as estirpes encontradas em Portugal com as do resto do mundo, permitindo assim a vigilância de casos autóctones ou alóctones.

As discrepâncias observadas na genotipagem com os genes *PLB1* e *URA5*, deveriam ser clarificadas, seja confirmando os perfis de restrição de ambos os genes, como recorrendo ao método de sequenciação, de modo a analisar os polimorfismos de cada gene. Com uma análise mais aprofundada do gene *PLB1*, e de outros, talvez seja possível no futuro otimizar a genotipagem destas espécies de forma rápida e consensual.

Com base nos testes de susceptibilidade antifúngica, novas alternativas antifúngicas são necessárias para o bom desenvolvimento da terapêutica. Apesar de já se considerar que o voriconazol tem maior eficácia do que o fluconazol (Pfaller *et al.* 2004, 2009; Souza *et al.* 2005; Sabatelli *et al.* 2006), e de já terem sido propostas outras alternativas terapêuticas como o posaconazol e isavuconazol (Pfaller *et al.* 2004; Sabatelli *et al.* 2006; Thompson *et al.* 2009), é crucial uma vigilância mais cuidadosa, e maior conhecimento sobre os mecanismos relacionados com a aquisição de resistência deste fungo patogénico aos fármacos antifúngicos, habitualmente prescritos para terapia criptocócica.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

AMINNEJAD, M., DIAZ, M., ARABATZIS, M., CASTAÑEDA, E., LAZERA, M., VELEGRAKI, A., MARRIOTT, D., SORRELL, T.C & MEYER, W. (2012) Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII, *Mycopathologia*, 173(5-6), pp.337–346.

ARCHIBALD, L.K., TUOHY, M.J., WILSON, D.A., NWANYANWU, O., KAZEMBE, P.N., TANSUPHASAWADIKUL, S., EAMPOKALAP, B., CHAOVAVANICH, A., RELLER, L.B., JARVIS, W.R., HALL, G.S. & PROCOP, G.W. (2004) Antifungal Susceptibilities of *Cryptococcus neoformans*, *Emerging Infectious Diseases*, 10(1), pp.143–145.

ASCIOGLU, S., REX, J.H., PAUW, B. de, BENNETT, J.E., BILLE, J., CROKAERT, F., DENNING, D.W., DONNELLY, J.P., EDWARDS, J.E., ERJAVEC, Z., FIERE, D., LORTHOLARY, O., MAERTENS, J., MEIS, J.F., PATTERSON, T.F., RITTER, J., SELLESLAG, D., SHAH, P.M., STEVENS, D.A. & WALSH, T.J. (2002) Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus, *Clinical Infectious Diseases*, 34(1), pp.7–14.

BEDOUT, C., ORDÓÑEZ, N., GÓMEZ, B.L., RODRÍGUEZ, M.C., ARANGO, M., RESTREPO, A. & CASTAÑEDA, E. (1999) *In vitro* antifungal susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *C. neoformans* var. *gattii*, *Revista Iberoamericana de Micología*, 16(1), pp.36–39.

BOEKHOUT, T., THEELEN, B., DIAZ, M., FELL, J.W., HOP, W.C.J., ABELN, E.C.A., DROMER, F., MEYER, W. (2001) Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*, *Microbiology*, 147, pp.891–907.

BOLANO, A., STINCHI, S., PREZIOSI, R., BISTONI, F., ALLEGRUCCI, M., BALDELLI, F., MARTINI, A., CARDINALI, G. (2001) Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*, *FEMS Yeast Research*, 1, pp.221–224.

BOVERS, M., HAGEN, F., KURAMAE, E.E., DIAZ, M., SPANJAARD, L., DROMER, F., HOOGVELD, H.L., BOEKHOUT, T. (2006) Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, *FEMS Yeast Research*, 6(4), pp.599–607.

BUCHANAN, K.L. & MURPHY, J.W., (1998) What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?, *Emerging Infectious Diseases*, 4(1), pp.71–83.

CASADEVALL, A., SPITZER, E.D., WEBB, D., RINALDI, M.G. (1993) Susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis to amphotericin B and fluconazole, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(6), pp.1383–1386.

CASADEVALL, A. & PERFECT, J.R. (1998) *Cryptococcus neoformans*, *American Society of Microbiology Press*, Washington DC.

CASALI, A.K., GOULART, L., SILVA, L.K.R., RIBEIRO, A.M., AMARAL, A.A., ALVES, S.H., SCHRANK, A., MEYER, W., VAINSTEIN, M.H. (2003) Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul, *FEMS Yeast Research*, 3(4), pp.405–415.

---

CHEN, S., MULLER, M., ZHOU, J.Z., WRIGHT, L.C., SORRELL, T.C. (1997) Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor?, *The Journal of Infectious Diseases*, 175(2), pp.414–420.

CHEN, S., SORRELL, T., NIMMO, G., SPEED, B., CURRIE, B., ELLIS, D., MARRIOT, D., PFEIFFER, T., PARR, D., BYTH, K. & AUSTRALASIAN CRYPTOCOCCAL STUDY GROUP (2000) Epidemiology and Host- and Variety-Dependent Characteristics of Infection Due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand, *Clinical Infectious Diseases*, 31, pp.499–508.

CLANCY, C.J., NGUYEN, M.H., ALANDOERFFER, R., CHENG, S., ICZKWOWSKI, K., RICHARDSON, M., GRAYBILL, J.R. (2006) *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates recovered from persons with AIDS demonstrate a wide range of virulence during murine meningoencephalitis that correlates with the expression of certain virulence factors, *Microbiology*, 152, pp.2247–2255.

COX, G.M., MCDADE, H.C., CHEN, S.C.A., TUCKER, S.C., GOTTFREDSSON, M., WRIGHT, L.C., SORRELL, T.C., LEIDICH, S.D., CASADEVALL, A., GHANNOUM, M.A. & PERFECT, J.R. (2001) Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*, *Molecular Microbiology*, 39(1), pp.166–175.

DESNOS-OLLIVIER, M., PATEL, S., SPAULSING, A.R., CHARLIER, C., GARCÍA-HERMOSO, D., NIELSEN, K. & DROMER, F. (2010) Mixed Infections and In Vivo Evolution in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*, *mBio*, 11(1).

DROMER, F., RONIN, O. & DUPONT, B. (1992) Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from an evidence for dormant infection in healthy subjects, *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 30, pp.395–397.

DROMER, F., MATHOULIN, S., DUPONT, B., LAPORTE, A & FRENCH CRYPTOCOCCOSIS STUDY GROUP (1993) Epidemiology of Cryptococcosis in France : A 9-Year Survey ( 1985-1993 ), *Clinical Infectious Diseases*, 23, pp.82–90.

ELLIS, D. & PFEIFFER, T.J., (1990) Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, *Journal of Clinical Microbiology*, 28(7), pp.1642–1644.

ELLIS, D., DAVIS, S., ALEXIOU, H., HANDKE, R. & BARTLEY, R. (2007) Descriptions of Medical Fungi Second Edi., Australia: By the authors.

ENG, R.H.K. & PERSON, A., (1981) Serum cryptococcal antigen determination in the presence of rheumatoid factor, *Journal of Clinical Microbiology*, 14(6), pp.700–702.

ENOCH, D.A., LUDLAM, H.A. & BROWN, N.M. (2006) Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options, *Journal of Medical Microbiology*, 55, pp.809–818.

FELL, J.W., BOEKHOUT, T., FONSECA, A., SCORZETTI, G. & STATZELL-TALLMAN, A. (2000) Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, pp.1351–1371.

FENG, X., YAO, Z., REN, D. & LIAO, W. (2008) Simultaneous identification of molecular and mating types within the *Cryptococcus* species complex by PCR-RFLP analysis, *Journal of Medical Microbiology*, 57, pp.1481–1490.

FRASÉS, S., FERRER, C., SÁNCHEZ, M. & COLOM-VALIENTE, M.F. (2009) Molecular epidemiology of isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Spain, *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(2), pp.112–117.

FRANZOT, S.P., MUKHERJEE, J., CHERNIAK, R., CHEN, L-C., HAMDAN, J.S. & CASADEVALL, A. (1998) Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. *Infection and Immunity*, 66(1), pp.89–97.

FREYDIERE, A., GUINET, R. & BOIRON, P. (2001) Yeast identification in the clinical microbiology laboratory : phenotypical methods, *Medical Mycology*, 39, pp.9–33.

FRIES, B.C., CHEN, F., CURRIE, B.P. & CASADEVALL, A. (1996) Karyotype instability in *Cryptococcus neoformans* infection, *Journal of Clinical Microbiology*, 34(6), pp.1531–1534.

GARCIA-HERMOSO, D., JANBON, G. & DROMER, F. (1999) Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection, *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), pp.3204–3209.



---

GARCIA-HERMOSO, D., DROMER, F., MATHOULIN-PELISSIER, S. & JANBON, G. (2001) Are Two *Cryptococcus neoformans* Strains Epidemiologically Linked?, *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), pp.1402–1406.

GHANNOUM, M.A., (2000) Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis, *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), pp.122–143.

GUINEA, J., HAGEN, F., PELÁEZ, T., BOEKHOUT, T., TAHOUNE, H., TORRES-NARBONA, M. & BOUZA, E. (2010) Antifungal susceptibility, serotyping, and genotyping of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected during 18 years in a single institution in Madrid, Spain, *Medical Mycology*, 48(7), pp.942–948.

HAGEN, F., ASSEN, S.V., LUIJCKX, G.J., BOEKHOUT, T. & KAMPINGA, G.A (2010a) Activated dormant *Cryptococcus gattii* infection in a Dutch tourist who visited Vancouver Island (Canada): a molecular epidemiological approach, *Medical Mycology*, 48(3), pp.528–531.

HAGEN, F., ILLNAIT-ZARAGOZI, M.T., BARTLETT, K.H., SWINNE, D., GEERTSEN, E., KALAASSEN, C.H.W., BOEKHOUT, T. & MEIS, J.F. (2010b) In vitro antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12), pp.5139–5145.

HAIJEH, R.A., CONN, L.A., STEPHENS, S.D., BAUGHMAN, W., HAMILL, R., GRAVISS, E., PAPPAS, P.G., THOMAS, R., REINGOLD, A., ROTHROCK, G., HUTWAGNER, L.C., SCHUCHAT, A., BRANDT, M.E., PINNER, R.W. & CRYPTOCOCCAL ACTIVE SURVEILLANCE GROUP (1999) Cryptococcosis : Population-Based Multistate Active Surveillance and Risk Factors in Human Immunodeficiency Virus – Infected Persons, *The Journal of Infectious Diseases*, 179, pp.449–454.

HARRISON, T.S., (2000) *Cryptococcus neoformans* and cryptococcosis, *The Journal of Infection*, 41(1), pp.12–17.

HAYNES, K.A., SULLIVAN, D.J., COLEMAN, D.C., CLARKE, J.C.K., EMILIANUS, R., ATKINSON, C. & CANN, K.J. (1995) Involvement of multiple *Cryptococcus neoformans* strains in a single episode of cryptococcosis and reinfection with novel strains in recurrent infection demonstrated by random amplification of polymorphic DNA and DNA fingerprinting, *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1), pp.99–102.

HOGAN, L.H., KLEIN, B.S. & LEVITZ, S.M. (1996) Virulence factors of Medically Important Fungi, *Clinical Microbiology Reviews*, 9(4), pp.469–488.

HULL, C.M. & HEITMAN, J., (2002) Genetics of *Cryptococcus neoformans*, *Annual Review of Genetics*, 36, pp.557–615.

HUSAIN, S., WAGENER, M.M. & SINGH, N. (2001) *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome, *Emerging Infectious Diseases*, 7(3), pp.375–381.

IGREJA, R.P., LÁZERA, M.S., WANKE, B., GALHARDO, M.C.G., KIDD, S.E. & MEYER, W. (2004) Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro, *Medical Mycology*, 42(3), pp.229–238.

IQBAL, N., DEBESS, E.E., WOHRLE, R., SUN, B., NETT, R.J., AHLQUIST, A.M., CHILLER, T. & LOCKHART, S.R. (2010) Correlation of genotype and in vitro susceptibilities of *Cryptococcus gattii* strains from the Pacific Northwest of the United States, *Journal of Clinical Microbiology*, 48(2), pp.539–544.

JACOBSON, E.S. & TINNELL, S.B., (1993) Antioxidant function of fungal melanin, *Journal of Bacteriology*, 175(21), pp.7102–7104.

KAVANAUGH, L.A., FRASER, J.A. & DIETRICH, F.S. (2006) Recent evolution of the human pathogen *Cryptococcus neoformans* by intervarietal transfer of a 14-gene fragment. *Molecular Biology and Evolution*, 23(10), pp.1879–1890.

KHAN, Z.U., RANDHAWA, H.S., KOWSHIK, T., CHOWDHARY, A. & CHANDY, R. (2007) Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from decayed wood of trunk hollows of *Ficus religiosa* and *Syzygium cumini* trees in north-western India, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(2), pp.312–316.

KIDD, S., HITCHCOCK, C., MASZEWSKA, K., BALAKRISHNAN, P., HUNT, C., RAJENDRAN, P., USHA, A.R., THYAGARAJAN, S.P., SORRELL, T.C. & MEYER, W. (2001) Molecular Epidemiology of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* from Tamil Nadu, India, *Australasian Mycologist*, 20(3), pp.105–114.

KONTOYIANNIS, D.P., PEIRSCH, W.K., REDDY, B.T., WHIMBEY, E.E, HAN, X.Y., BODEY, G.P. & REISTON, K.V.I. (2001) Cryptococcosis in patients with cancer, *Clinical Infectious Diseases*, 32(11), pp.E145–150.

LATOUCHE, G.N., SORRELL, T.C. & MEYER, W. (2002) Isolation and characterisation of the phospholipase B gene of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, *FEMS yeast research*, 2(4), pp.551–561.

LATOUCHE, G.N., HUYNH, M., SORRELL, T.C. & MEYER, W. (2003) PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the Phospholipase B (PLB1) Gene for Subtyping of *Cryptococcus neoformans* Isolates, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), pp.2080–2086.

LI, S.S. & MODY, C.H., (2010) *Cryptococcus*, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7(3), pp.186–196.

LI, W., AVERETTE, A.F., DESNOS-OLLIVIER, M., NI, M., DROMER, F. & HEITMAN, J. (2012) Genetic Diversity and Genomic Plasticity of *Cryptococcus neoformans* AD Hybrid Strains. *G3*, 2(1), pp.83–97.

LIAW, S.-J., WU, H.-C. & HSEUH, P.-R. (2010) Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan: serotypes, mating types, molecular types, virulence factors, and antifungal susceptibility, *Clinical Microbiology and Infection*, 16(6), pp.696–703.

LIN, X. & HEITMAN, J., (2006) The Biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex, *Annual Review of Microbiology*, 60, pp.69–105.

LUI, G., LEE, N., IP, M., CHOI, K.W., TSO, Y.K., LAM, E., CHAU, S., LAI, R. & COCKRAM, C.S. (2006) Cryptococcosis in apparently immunocompetent patients, *QJMed*, 99(3), pp.143–151.

MANFREDI, R. & CALZA, L., (2008) Severe brain co-infection with *Cryptococcus neoformans* and *Mycobacterium tuberculosis* in a young, otherwise healthy student recently immigrated from China, *International Journal of Infectious diseases*, 12(4), pp.438–441.

MARTINS, M.L., (2002) Polimorfismos Genéticos e Diagnóstico Molecular de *Cryptococcus neoformans*, *Instituto de Higiene e Medicina Tropical - Universidade Nova de Lisboa*.

MEYER, W., CASTAÑEDA, A., JACKSON, S., HUYNH, M., CASTAÑEDA, E. & IBEROAMERICAN CRYPTOCOCCAL STUDY GROUP (2003) Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates, *Emerging Infectious Diseases*, 9(2), pp.189–195.

MEYER, W. & TRILLES, L., (2010) Genotyping of the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex, *Australian Biochemist*, 6(1), pp.11–15.

MITCHELL, T.G. & PERFECT, J.R., (1995) Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*, *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), pp.515–548.

MLINARIC-MISSONI, E., HAGEN, F., CHEW, W.H.M., VAZIC-BABIC, V., BOEKHOUT, T. & BEGOVAC, J. (2011) *In vitro* antifungal susceptibilities and molecular typing of sequentially isolated clinical *Cryptococcus neoformans* strains from Croatia, *Journal of Medical Microbiology*, 60(10), pp.1487–1495.

MOORE, T.D.E. & EDMAN, J. (1993) The alpha-mating type locus of *Cryptococcus neoformans* contains a peptide pheromone, *Molecular and Cellular Biology*, 13(3), pp.1962–1970.

MSEDDI, F., JARBOUI, M.A., SELLAMI, A., SELLAMI, H. & AYADI, A. (2011) A rapid and easy method for the DNA extraction from *Cryptococcus neoformans*, *Biological procedures online*, 13(1), p.5.

NOVERR, M.C., COX, G.M., PERFECT, J.R. & HUFFNAGLE, G.B. (2003) Role of *PLB1* in Pulmonary Inflammation and Cryptococcal Eicosanoid Production, *Infection and Immunity*, 71(3), pp.1538–1547.

OSUNA, A., CARRAGOSO, A., LEMOS, A., MOCHO, M.L. & GASPAR, O. (2008) Criptococose, *Acta Médica Portuguesa*, 21, pp.307–313.

---

PEREA, S. & PATTERSON, T.F., (2002) Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi. *Clinical Infectious Diseases*, 35, pp.1073–1080.

PERFECT, J.R., (2006) *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot, *FEMS yeast research*, 6(4), pp.463–468.

PFALLER, M.A., MESSER, S.A., BOYKEN, L., HOLLIS, R.J., RICE, C., TENDOLKAR, S. & DIEKEMA, D.J. (2004) *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 48(3), pp.201–205.

PFALLER, M.A., MESSER, S.A., BOYKEN, L., RICE, C., TENDOLKAR, S., HOLLIS, R.J., DOERN, G.V. & DIEKEMA, D.J. (2005) Global Trends in the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004), *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), pp.2163–2167.

PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J., GIBBS, D.L., NEWELL, V.A., BIJIE, H., DZIERZANOWSKA, D., KLIMKO, N.N., LETSCHER-BRU, V., LISALOVA, M., MUEHLETHALER, K., RENNISON, C., ZAIDI, M. & GLOBAL ANTIFUNGAL SURVILLANCE GROUP (2009) Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10,5 year analysis of susceptibilities of Noncandidal Yeast Species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing, *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1), pp.117–123.

PINCUS, D.H., ORENGA, S. & CHATELLIER, S. (2007) Yeast identification-past, present, and future methods, *Medical Mycology*, 45(2), pp.97–121.

RAMANI, R., GROMADZKI, S., PINCUS, D.H., SLAKIN, I.F. & CHATURVEDI, V. (1998) Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates, *Journal of Clinical Microbiology*, 36(11), pp.3396–3398.

REX, J.H., PFALLER, M.A., WALSH, T.J., CHATURVEDI, V., ESPINEL-INGROFF, A., GHANNOUM, M.A., GOSEY, L.L., ODDS, F.C., RINALDI, M.G., SHEEHAN, D.J. & WARNOCK, D.W. (2001) Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenge,. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), pp.643–658.

RHODES, J.C., POLACHECK, I. & KWON-CHUNG, K.J. (1982) Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*, *Infection and Immunity*, 36(3), pp.1175–1184.

SABATELLI, F., MESSER, S.A., BOYKEN, L., HOLLIS, R.J., RICE, C., TENDOLKAR, S. & DIEKEMA, D.J. (2006) *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(6), pp.2009–2015.

SAHA, D.C., XESS, I. & JAIN, N. (2008) Evaluation of conventional & serological methods for rapid diagnosis of cryptococcosis, *The Indian Journal of Medical Research*, 127(5), pp.483–488.



SAITOU, N. & NEI, M., (1987) The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), pp.406–425.

SHELBURNE, S.A., DARCOUNT, J., WHITE, A.C., GREENBERG, S.B., HAMILL, R.J., ATMAR, R.L. & VISNEGARWALA, F. (2005) The role of immune reconstitution inflammatory syndrome in AIDS-related *Cryptococcus neoformans* disease in the era of highly active antiretroviral therapy, *Clinical Infectious Diseases*, 40(7), pp.1049–1052.

SILVA, I., (2010) Tipagem molecular de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans*. Instituto de Higiene e Medicina Tropical - Universidade Nova de Lisboa.

SINGH, N., DROMER, F., PERFECT, J.R. & LORTHOLARY, O. (2008) Cryptococcosis in solid organ transplant recipients: current state of the science, *Clinical Infectious Diseases*, 47(10), pp.1321–1327.

SORRELL, T.C., BROWNLEE, A.G., RUMA, P., MALIK, R., PFEIFFER, T.J. & ELLIS, D.H. (1996) Natural environmental sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), pp.1261–1263.

SORVILLO, F., BEALL, G., TURNER, P.A., BEER, V.L., KOVACS, A.A. & KERNDT, P.R. (1997) Incidence and factors associated with extrapulmonary cryptococcosis among persons with HIV infection in Los Angeles County, *AIDS*, 11(5), pp.673–679.

SOUZA, L.K.H., FERNANDES, O.F.L., KOBAYASHI, C.C.B.A., PASSOS, X.S., COSTA, C.R., LEMOS, J.A., SOUSA-JÚNIOR, A.H. & SILVA, M.R.R. (2005) Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 47(5), pp.253–256.

ST.-GERMAIN, G. & BEAUCHESNE, D., (1991) Evaluation of the MicroScan Rapid Yeast Identification panel, *Journal of Clinical Microbiology*, 29(10), pp.2296–9.

STEENBERGEN, J.N., SHUMAN, H.A. & CASADEVALL, A. (2001) *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), pp.15245–15250.

SZABÓ, Z., TÓTH, B., KOVÁCS, M., KARDOS, G., MARÁZ, A., ROZGONYI, F. & MAJOROS, L. (2008) Evaluation of the new Micronaut-*Candida* system compared to the API ID32C method for yeast identification, *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), pp.1824–1825.

TAY, S.T., LIM, H.C., TAJUDDIN, T.H., ROHANI, M.Y., HAMIMAH, H. & THONG, K.L. (2006) Determination of molecular types and genetic heterogeneity of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* in Malaysia, *Medical Mycology*, 44, pp.617–622.

THOMPSON, G.R., WIEDERHOLD, N.P., FOTHERGILL, A.W., VALOOR, A.C., WICKES, B.L. & PATTERSON, T.F. (2009) Antifungal susceptibilities among different serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(1), pp.309–311.

TINTELNOT, K., SCHÄR, G. & POLAK, A. (2001) Epidemiological data of cryptococcosis in Austria, Germany and Switzerland: part of the ECMM survey in Europe, *Mycosis*, pp.345–350.

TORRES-RODRÍGUEZ, J.M., ALVARADO-RAMÍREZ, E., MURCIANO, F. & SELLART, M. (2008) MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(1), pp.205–206.

TRILLES, L., FERNANDÉZ-TORRES, B., LAZÉRA, M.S., WANKE, B. & GUARRO, J. (2004) *In Vitro* Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus gattii*, *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), pp.4815–4817.

TRILLES, L., LAZÉRA, M.S., WANKE, B., OLIVEIRA, R.V., BARBOSA, G.G., NISHIKAWA, M.M., MORALES, B.P. & MEYER, M. (2008) Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103 (August), pp.455–462.

TRILLES, L., MEYER, W., WANKE, B., GUARRO, J. & LAZÉRA, M. (2012) Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii* species complex, *Medical Mycology*, 50 (April), pp.328–332.

VAN TONGEREN, L., SHAI PANICH, T. & FLEETHAM, J.A. (2011) Coinfection with *Cryptococcus gattii* and *Mycobacterium tuberculosis* in an otherwise healthy 18-year-old woman, *Canadian Respiratory Journal*, 18(4), pp.62–63.

VIANA, G., (2007) Técnicas para Construção de Árvores Filogenéticas. Universidade Federal do Ceará.

VIVIANI, M.A., COGLIATI, M., ESPOSO, M.C., LEMMER, K., TINTELNOT, K., VALIENTE, M.F.C., SWINNE, D., VELEGRAKI, A., VELHO, R. & EUROPEAN CONFEDERATION OF MEDICAL MYCOLOGY (ECMM) CRYPTOCOCCOSIS WORKING GROUP (2006) Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. *FEMS Yeast Research*, 6(4), pp.614–619.

WHITE, T.C., MARR, K.A. & BOWDEN, R.A. (1998) Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance, *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), pp.382–402.

## **ANEXOS**

---